

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Participación de las nanopartículas calcificantes en la etiopatogenia de
la valvulopatía aórtica degenerativa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eduardo Villacorta Argüelles

Directores

Francisco Fernández-Avilés
Pedro Luis Sánchez Fernández

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid



TESIS DOCTORAL

**Participación De Las Nanopartículas Calcificantes
En La Etiopatogenia De La Valvulopatía Aórtica
Degenerativa**

Autor: Eduardo Villacorta Argüelles

Directores: Francisco Fernández-Avilés
Pedro Luis Sánchez Fernández

Madrid, Septiembre 2013

Don Francisco Fernández-Avilés, Catedrático de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y Don Pedro Luis Sánchez Fernández, Profesor Asociado de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que Don Eduardo Villacorta Argüelles, Licenciado en Medicina por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Participación De Las Nanopartículas Calcificantes En La Etiopatogenia De La Valvulopatía Aórtica Degenerativa” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 15 de Septiembre de 20013

Prof. Francisco Fernández-Avilés

Dr. Pedro Luis Sánchez

Resumen

Antecedentes: La estenosis aórtica es actualmente la valvulopatía más frecuente en los países desarrollados, y es probable su incidencia continúe aumentando, debido al mayor envejecimiento de la población. Se trata de un proceso activo, que se caracteriza por una calcificación distrófica de las cúspides valvulares, y un estrechamiento del orificio valvular aórtico. En la calcificación participan un gran número de mecanismos patogénicos complejos, no del todo conocidos.

Objetivos: Establecer la posible implicación de las nanopartículas en la etiopatogenia de la estenosis aórtica degenerativa a partir de las válvulas obtenidas por cirugía; investigar el posible origen biológico de las mismas mediante el análisis del perfil metabólico de los medios de cultivo y la búsqueda de material genético; e identificar predictores clínicos del crecimiento de las nanopartículas.

Material y método: Se realizó un estudio casos-contrroles, para lo cual se incluyeron un total de 115 pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, entre enero de 2004 y febrero 2007. A los pacientes incluidos estaba indicada la sustitución de la válvula aórtica enferma por una prótesis, o estaba indicado la realización de un trasplante cardiaco.

Resultados: Los 115 pacientes se dividieron en 4 grupos de estudio, según la patología de base: grupo 1, estenosis aórtica severa aislada (n=60); grupo 2, doble lesión aórtica, con estenosis severa (n=34); grupo 3, insuficiencia aórtica severa aislada (n=13); y grupo 4, trasplante cardiaco (n=8). La edad media en el grupo global fue de 70 años. Se trataba en su mayoría de pacientes varones (65%). El antecedente personal más frecuente fue la hipertensión arterial (57%), seguido de la dislipemia (42%), de diabetes mellitus (24%), mientras que los pacientes con antecedentes de tabaquismo actual o en el pasado constituían solamente un 10%. En relación con el tratamiento médico, destacó el empleo de diuréticos (43%), estatinas (37%), y antiagregantes (35%). El cultivo fue positivo en 29 pacientes (48%) del grupo de la estenosis aórtica grave pura; en 23 pacientes (68%) del grupo de pacientes con doble lesión aórtica; en 4 pacientes (31%) del grupo de pacientes con insuficiencia aórtica grave pura; y en 0 pacientes (0%) del grupo de trasplante cardiaco. Al observar los cultivos positivos mediante microscopía electrónica nos encontramos con unas partículas pleomórficas, donde pudimos identificar la cápsula granulosa, y que el calcio y el fósforo eran sus principales componentes. Al comparar

los diferentes grupos entre sí observamos que había diferencias en relación con la edad de los pacientes ($p < 0.001$), el sexo masculino ($p = 0.016$), el antecedente de tabaquismo ($p < 0.001$) y el antecedente de revascularización coronaria ($p = 0.012$). El crecimiento de las nanopartículas en las válvulas aórticas también había diferencias entre los distintos grupos, con una mayor frecuencia de cultivos positivos en los grupos de estenosis aórtica (grupos 1 y 2) respecto a los grupos sin estenosis (grupos 2 y 3) ($p = 0.003$). El único predictor de crecimiento de nanopartículas en la estenosis aórtica fue el sexo masculino (RR 2,65, IC 95%: 1.134-6.183; $p = 0.02$).

Para intentar determinar qué variables se asociaron con la estenosis aórtica dividimos el total de la muestra en dos grupos: pacientes con estenosis aórtica en el (grupo 1 y 2); y grupo control (grupo 3 y 4). En el análisis univariado encontramos que los pacientes con estenosis aórtica eran mayores (71 ± 7.5 vs 61 ± 11 ; $p = 0.001$), hubo menor proporción de hombres (59% vs 95%; $p = 0.001$), eran menos fumadores (3% vs 38%; $p < 0.001$), eran tratados con menor frecuencia con IECAs (17% vs 43%; $p = 0.021$), y diuréticos (38% vs 62%; $p = 0.048$), hubo un mayor crecimiento de nanopartículas en los cultivos de las válvulas aórticas de los pacientes con estenosis aórtica, respecto a los cultivos de las válvulas del grupo sin valvulopatía aórtica degenerativa (55% vs 19%; $p = 0.002$). En el análisis multivariado permanecieron en el modelo final la presencia de cultivo aórtico positivo (RR 3,94, IC 95%: 1.17-13.26; $p = 0.027$), edad > 65 años (RR 3,42, IC 95%: 1.14-10.22; $p = 0.028$), y la ausencia de tratamiento con IECAs (RR 0,24, IC 95%: 0.08-0.76; $p = 0.015$).

Para investigar el posible origen biológico de las nanopartículas se seleccionaron de forma aleatoria 6 pacientes de la muestra total con válvulas con crecimiento positivo. Se analizaron los perfiles metabólicos de ^1H -RM de los medios de cultivo de las nanopartículas, y no se apreció diferencia alguna de las muestras. También se evaluaron los medios de cultivo mediante la determinación de la presencia de gen bacteriano 16sRNA, sin encontrarse diferencias con el control negativo.

Conclusión: Se ha demostrado la presencia de las nanopartículas calcificantes en las válvulas calcificadas de los pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa, y su relación con la etiopatogenia de la estenosis aórtica. Las nanopartículas calcificantes no han presentado actividad metabólica, ni se ha demostrado la presencia de ácidos nucleicos; por tanto, no deben ser consideradas organismos vivos.

Fuentes de financiación

Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el marco de investigación de la Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Asimismo, el doctorando ha disfrutado de las siguientes contratos de investigación durante la realización de esta tesis: Contrato de profesionales sanitarios que hayan finalizado el periodo de formación sanitaria especializada (Contrato postMIR) del Instituto de Salud Carlos III (2010-2012), y un contrato de investigación de la Red Temática de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA) (2012-2013), Ministerio de Ciencia e Innovación.

Agradecimientos

A Cristina, mi pareja, por estar siempre a mi lado. Sin tu cariño, apoyo y estímulo constante esta tesis no se habría finalizado. Disculpas por todo el tiempo que su elaboración nos ha robado.

A mis padres y familia por toda vuestra generosidad, las preocupaciones compartidas, y todos los buenos consejos. Esta tesis es la culminación de los valores que me habéis enseñado desde la infancia.

A Pedro Luis Sánchez, más que un director de tesis, lo considero mi mentor. Es uno de los mejores ejemplos de superación que tengo, tanto a nivel profesional como personal. Gracias por todas las recomendaciones, el buen asesoramiento, y estímulo constante, no solo en esta tesis, sino en mi día a día.

A Francisco Fernández-Avilés, por aleccionarme a diario a conseguir la excelencia en la práctica clínica, y por estimularme en mantener un continuo interés en la investigación.

A Cándido Martín-Luengo, por darme la primera oportunidad de involucrarme en el mundo de la cardiología, y guiarme en mis primeros pasos como alumno interno en la Universidad de Salamanca.

A Miguel Ángel Bratos-Pérez, sin su colaboración con el cultivo de las válvulas aórticas y con el análisis mediante microscopía electrónica de los mismos, no habría podido realizar esta tesis.

A Pedro Pabón, por enseñarme tantas cosas de la cardiopatía isquémica y de la investigación clínica.

A Ignasi Barba, sin el cual los experimentos de análisis metabólico no habrían sido posibles.

Después de tantos años hay mucho que agradecer. Realmente es difícil hacer justicia en tan pocas palabras, y muchas las personas con las que he compartido este tiempo. Me gustaría agradecer a todos los que integran los servicios de cardiología del Hospital Clínico de Valladolid, del Hospital Universitario Vall d'Hebron, y del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por compartir todos estos años trabajando juntos en una especialidad tan fascinante.

A mis padres
A Cristina

La constancia es el complemento indispensable de todas las demás virtudes

Giuseppe Mazzini

Índice general

0	Glosario de términos	1
1	Introducción	3
1	La valvulopatía aórtica degenerativa	3
1.1	Entidades	4
1.2	Epidemiología	6
1.1.2.1	Prevalencia	6
1.3	Progresión	9
1.3.1	Progresión de válvula normal a esclerosis aórtica	9
1.3.2	Progresión de esclerosis aórtica a estenosis aórtica	9
1.3.3	Progresión de la estenosis aórtica	10
1.4	Pronóstico	13
1.4.1	Morbilidad	13
1.4.2	Mortalidad	13
1.5	Lesión característica de la valvulopatía aórtica degenerativa	16
1.5.1	Válvula aórtica normal	16
1.5.2	Valvulopatía aórtica degenerativa	16
1.6	Mecanismos fisiopatológicos de la estenosis aórtica	19
1.6.1	Factores genéticos	19
1.6.2	Factores iniciales	20
1.6.3	Función endotelial	21
1.6.4	Mecanismos inflamatorios	22
1.6.5	Metabolismo lipídico	23
1.6.6	Péptidos natriuréticos	24
1.6.7	Calcificación valvular	24
1.7	Comparación de la fisiopatología de la valvulopatía aórtica y de la aterosclerosis	27
1.8	Opciones terapéuticas	29
1.8.1	Tratamiento farmacológico	29
1.8.1.1	Estatinas	29
1.8.1.2	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina/Antagonistas del receptor de la angiotensina II	30
1.8.1.3	Bloqueo de la aldosterona	31

1.8.1.4	Bifosfonatos	31
1.8.2	Tratamiento quirúrgico	32
1.8.3	Nuevas opciones terapéuticas	33
1.8.3.1	Implante de prótesis percutánea	33
1.8.3.2	Células madre	34
2	Las nanopartículas calcificantes	35
2.1	Definición	35
2.2	Características de las nanopartículas	36
2.3	Controversia de la naturaleza de las nanopartículas	37
2.4	Asociación de las nanopartículas con patologías humanas	39
3	Justificación del estudio	40
2	Hipótesis y objetivos	41
2.1	Hipótesis	41
2.1.1	Hipótesis nula	41
2.1.2	Hipótesis alternativa	41
2.2	Objetivos	42
2.2.1	Objetivo principal	42
2.2.2	Objetivos secundarios	42
2.3	Interés científico	43
3	Material y métodos	45
3.1	Sujetos del estudio	45
3.2	Criterios de inclusión	45
3.3	Criterios de exclusión	47
3.4	Variables evaluadas	48
3.4.1	Variables demográficas	48
3.4.2	Factores de riesgo cardiovascular y otros antecedentes	48
3.4.3	Variables de tratamiento médico	48
3.4.4	Variables analíticas realizadas antes de la intervención quirúrgica	49
3.4.5	Variables ecocardiográficas	49
3.4.6	Variables angiográficas	50
3.5	Definiciones	50
3.6	Cultivo de las válvulas aórticas	54
3.7	Análisis mediante microscopía electrónica de los cultivos de las nanopartículas	55
3.8	Análisis metabolómico de los cultivos de las nanopartículas	56
3.8.1	Espectroscopia	56

3.8.2	Identificación de patrones	57
3.9	Análisis material genético de los cultivos de las nanopartículas	57
3.10	Análisis estadístico	58
3.10.1	Estimación del tamaño muestral	58
3.10.2	Variables cualitativas y cuantitativas	59
3.10.3	Análisis multivariante	59
4	Resultados	61
4.1	Población del estudio	62
4.2	Resultados globales descriptivos	63
4.2.1	Variables demográficas y clínicas	63
4.2.2	Variables de tratamiento médico	64
4.2.3	Variables analíticas	65
4.2.4	Variables ecocardiográficas y angiográficas	65
4.3	Cultivo de las válvulas aórticas	67
4.3.1	Resultado positivo de las válvulas aórticas	67
4.3.2	Análisis mediante microscopía electrónica del cultivo de las nanopartículas	68
4.3.2.1	Microscopía electrónica de barrido	68
4.3.2.2	Microscopía electrónica de transmisión	69
4.3.2.3	Análisis por fluorescencia de rayos X	70
4.4	Análisis diferencial entre los distintos grupos	72
4.4.1	Análisis univariado	72
4.5	Factores predictores de valvulopatía aórtica degenerativa	75
4.5.1	Análisis univariado de la estenosis aórtica	75
4.5.2	Análisis multivariado de la estenosis aórtica	78
4.6	Factores predictores de crecimiento de nanopartículas en las valvulopatías aórtica degenerativa	80
4.6.1	Análisis univariado	80
4.6.2	Análisis multivariado	82
4.7	Análisis metabolómico del medio de cultivo de válvulas con cultivo positivo vs medio DMEM	83
4.8	Análisis genético del medio de cultivo de válvulas con crecimiento de nanopartículas	87
5	Discusión	89
5.1	Idea principal	89
5.2	Factores de riesgo asociados a la estenosis aórtica	90

5.2.1	Factores de riesgo asociados con la estenosis aórtica	90
5.2.2	Factores predictores relacionados con el crecimiento de las nanopartículas en las válvulas aórticas	91
5.2.3	Análisis de factores en los diferentes grupos	92
5.3	Naturaleza de las nanopartículas	94
5.3.1	Determinación del material genético	94
5.3.2	Metabolismo de las nanopartículas	95
5.3.3	Hipótesis de la naturaleza de las nanopartículas	95
5.4	Hipótesis derivada de nuestro trabajo: la fisiopatología de la estenosis aórtica severa	97
5.4.1	Fetuina-A	97
5.4.1.1	Papel fisiológico de la fetuina-A	97
5.4.1.2	Relación de la fetuina-A con la valvulopatía aórtica	97
5.4.2	Centros de nucleación	98
5.5	Implicaciones terapéuticas	101
5.6	Limitaciones	102
6	Conclusiones	105
Apéndice I	Índice de tablas	107
Apéndice II	Índice de figuras	109
Apéndice III	Trabajos derivados de esta Tesis	111
7	Bibliografía	113

Glosario de términos

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ARA II	Antagonista del receptor de angiotensina-II
AT	Angiotensina
ASTRONOMER	The aortic stenosis progression observation: meassuring effects of rosuvastatin trial
BMP	Proteínas formadoras de hueso
BNP	Péptido Cerebral Natriurético
Bsml/b	Alelo específico b del receptor de la vitamina D
CAD11	Gen codificador de la proteína cadherina 11
CEACAM	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
CNP	Nanopartículas calcificantes
DMEM	Medio mínimo esencal de Eagle modificado por Dulbeco
D₂O	Óxido de deuterio
EDTA	Sal ácida etilenediaminotetraacético disódica
ET	Endotelina
FEVI	Fracción de eyección de ventrículo izquierdo
FKL	Factor de Krüppel-like
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IC	Intervalo de confianza
ICAM	Moléculas de adhesión intercelulares
ICP	Intervención coronaria percutánea
IECA	Inhibidor del enzima convertidor de angiotensina

IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lrp5	Proteína receptora de la lipoproteína 5
MHz	Megahercio
MMPs	Metaloproteinasas
MPG	Proteína ácido γ -carboxiglutámico de la matriz extracelular
NaOH	Hidróxido sódico
NO	Óxido nítrico
NOTCH1	Gen codificador de la proteína receptor NOTCH
NT-proBNP	Fragmento terminal de la molécula pro-BNP
OR	Razón de probabilidades
PARTNER	The placement of aortic transcatheter valve trial
PCR	Proteína C reactiva
POSTN	Gen codificador de la periostina
PvuII	Receptor específico de estrógeno α
RAAVE	Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium trial
RANKL	Ligando activador del receptor nuclear NF- κ B
RM	Resonancia magnética
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RR	Riesgo relativo
SALTIRE	The Scottish aortic stenosis and lipid lowering trial, impact on regression.
SEAS	Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis
TAVI	Implante de prótesis aórtica percutánea
TGF	Factor transformador del crecimiento
TC	Tomografía computerizada
TLR	Receptor Toll-like
TNFα	Tumoral Necrosis Factor- α (Factor de Necrosis tumoral α)
ZEST	Randomized trial of the aldosterone-receptor antagonist eplerone in asymptomatic moderate-severe aortic stenosis

Capítulo 1

Introducción

1. La valvulopatía aórtica degenerativa

La valvulopatía aórtica degenerativa es una enfermedad de carácter progresivo, que se caracteriza por un continuo engrosamiento y calcificación de los velos de la válvula aórtica y, finalmente, por una obstrucción en la apertura de la válvula. Esta entidad presenta en la actualidad una elevada incidencia y prevalencia, y es probable que en un futuro próximo continúe aumentando, debido al mayor envejecimiento de la población. Además, esta patología se asocia con una elevada morbilidad y mortalidad. A pesar de tener tan graves consecuencias, actualmente no existe un tratamiento eficaz para la enfermedad, salvo la cirugía cardiaca. De hecho, la intervención quirúrgica sobre la válvula aórtica es la segunda causa principal de indicación de cirugía cardiovascular, detrás de la cirugía de revascularización coronaria ¹.

Durante varias décadas se creía que la estenosis aórtica se trataba de un proceso pasivo, secundario al envejecimiento. Hoy en día, la teoría más aceptada es que la patogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa es similar a la de la aterosclerosis. No obstante, hay discrepancias en la prevalencia entre la cardiopatía isquémica y la estenosis aórtica, así como de las características de la lesión aterosclerótica y la lesión de la valvulopatía aórtica. Estas discrepancias ponen de manifiesto que, a pesar de compartir muchos mecanismos patogénicos, existen factores adicionales que contribuyen al desarrollo de la valvulopatía aórtica degenerativa ².

1.1 Entidades

La valvulopatía aórtica degenerativa se divide desde un punto de vista funcional en dos entidades: la esclerosis aórtica y la estenosis aórtica.

La esclerosis aórtica se puede considerar la fase inicial de la valvulopatía aórtica degenerativa. La característica fundamental de esta entidad es el engrosamiento patente de la válvula, que se puede visualizar de forma directa mediante métodos ecocardiográficos. Este engrosamiento valvular produce un flujo turbulento a nivel de la salida del ventrículo izquierdo, que se puede percibir en la exploración física con la auscultación cardíaca, pero no produce ninguna obstrucción en el flujo de salida del ventrículo izquierdo.

En este momento de la evolución no se ha desarrollado ningún tipo de complicación a nivel ventricular, ni el paciente ha presentado ningún síntoma desde el punto de vista clínico ³.

La estenosis aórtica se trata de una fase más avanzada de la valvulopatía aórtica degenerativa. En esta fase se produce una gran desestructuración de la válvula, que se acompaña normalmente con una gran cantidad de calcio en los velos, y, como resultado final, se produce una disminución del orificio de apertura de la válvula aórtica. Por lo tanto, en esta fase, sí que se produce una obstrucción a la salida de flujo sanguíneo del ventrículo izquierdo (**Tabla 1**).

Como resultado de dicha obstrucción, el paciente puede desarrollar mecanismos de compensación ventricular para evitar la aparición de síntomas, y una vez que dichos mecanismos no son suficientes, podría presentar los síntomas clínicos clásicos de esta fase de la enfermedad: angina de esfuerzo, síncope de esfuerzo, y clínica de insuficiencia cardíaca ⁴. El principal mecanismo de adaptación del ventrículo es una hipertrofia concéntrica marcada, que se puede visualizar en el electrocardiograma, así como en las pruebas de ecocardiografía convencional ³.

Tabla 1.- Datos ecocardiográficos de la esclerosis aórtica y la estenosis aórtica

	Velocidad aórtica max. m/s	Área valvular aórtica, cm ²
Esclerosis aórtica	≤2.5	Normal
Estenosis aórtica ligera	2.5-3.0	>1.5
Estenosis aórtica moderada	3.0-4.0	1.0-1.5
Estenosis aórtica grave	>0.4	<1.0

1.2 Epidemiología

En las últimas décadas hemos observado un importante cambio en la etiopatogenia de las valvulopatías en los países desarrollados. Durante muchos años la principal causa de las valvulopatías era secundaria a los cambios postinflamatorios producidos por la fiebre reumática. En cambio, en la actualidad, la etiología más frecuente en el mundo occidental es la degenerativa. En el registro europeo, “The Euro Heart Survey on Valvular Disease”, la prevalencia de la etiología degenerativa de la estenosis aórtica fue del 82% ⁵.

Este cambio en la etiología se ha producido como consecuencia del empleo de los antibióticos en las décadas anteriores, así como a una mejora en los sistemas de salud, que ha provocado un importante descenso en la etiología valvular reumática. Además, se ha producido un notable aumento en la esperanza de vida en la sociedad, y son numerosos los trabajos que asocian un mayor envejecimiento con una mayor prevalencia de la valvulopatía aórtica degenerativa ^{6,7}.

Se estima que en Estados Unidos en el año 2000 podría haber entre 4.2 y 5.6 millones de personas con valvulopatía aórtica. Además, estas cifras podrían ser superiores, porque la valvulopatía aórtica podrían estar infradiagnosticada. El trabajo de Nkomo VT et al ⁸, en el que se incluyeron 28000 pacientes, demostró que la valvulopatía infradiagnosticada podría ser aproximadamente de un 0.7% de la población general. Un trabajo de Eveborn GW et al ⁷ realizado en Europa, que se basa en una muestra poblacional, con una edad media del grupo inicial de 60 años, y un amplio seguimiento a lo largo del tiempo (14 años), mostró una tasa de incidencia anual del 4,9 0/00/año (IC 95% CI±0,81 0/00).

Por lo anteriormente expuesto la valvulopatía aórtica constituye un importante problema de salud para la sociedad, y sobre todo para el grupo de personas mayores de 65 años.

1.2.1 Prevalencia

La estenosis aórtica es en la actualidad la valvulopatía más frecuente, y una de las principales enfermedades cardiovasculares en los países desarrollados ⁹.

Hasta hace relativamente poco, la epidemiología de la estenosis aórtica degenerativa estaba condicionada por el hecho de que eran escasos los datos acerca de su prevalencia real en nuestro medio. Los números que manejábamos provenían de registros quirúrgicos o de fuentes más globales, como registros Europeos, que podrían no ser representativos de un ámbito geográfico y social más cercano. Sin embargo, un trabajo reciente de Ferreira-González et al ¹⁰ ha demostrado que la prevalencia de la estenosis aórtica en España es similar a trabajos previos.

La esclerosis aórtica es un hallazgo frecuente en la ecocardiografía actual. La prevalencia de la esclerosis aórtica oscila entre un 26% y un 54% de población con edades superiores a los 65 años ^{3,11,12,13,14,15}, y su prevalencia aumenta con la edad ^{10,16} (**Tabla 2**).

Tabla 2.- Prevalencia de la esclerosis aórtica en trabajos de distintos grupos.

Autor	n	Edad media	Prevalencia esclerosis aórtica
Stewart BF et al ¹⁶	5201	No disponible	En el grupo global 26% ; (>65 años: 20% ; 65-75: 35% ; >75: 48%)
Nightingale et al ³	425	68	50%
Otto CM et al ¹¹	5621	No disponible	29% :
Aronow et al ¹²	1980	81	42%
Lindroos M et al ¹³	501	No disponible	40%
Barasch E et al ¹⁴	5888	76	54%
Agmon Y et al ¹⁵	381	67	37%
Ferreira-González I et al ¹⁰	1068	No disponible	En el grupo global 45,4% ; (>85 años: 73,5%)

La prevalencia de la estenosis aórtica es inferior en comparación con la de la esclerosis. Oscila entre un 2 y 16% de adultos con edades superiores a los 65 años ^{11,12,13}. Al igual que la esclerosis la prevalencia aumenta con la edad ^{7,8,10} (**Tabla 3**).

Tabla 3.- Prevalencia de la estenosis aórtica en diferentes grupos.

Autor	n	Prevalencia estenosis aórtica
Stewart BF et al ¹⁶	5201	En el grupo global 2% ; (>65 años: 1.3% ; 65-75: 2.4% ; >75: 4%)
Otto CM et al ¹¹	5621	2%
Aronow WS et al ¹²	2358	16%
Lindroos M et al ¹³	501	2-3%
Ferreira-González I et al ¹⁰	1068	En el grupo global 3% ; (>85 años: 7.4%)
Eveborn GW et al ⁷	3273	(50-59 años: 0,2% ; 60-69 años: 1,3% ; 70-79 años: 3,9% ; 80-89 años: 9,8%)

Como consecuencia de un mayor envejecimiento de la población, es fácil suponer que su incidencia continúe aumentando en un futuro próximo, de manera que se convertirá en uno de los principales problemas sanitarios, sobre todo en el grupo de pacientes más mayores.

1.3 Progresión

Existen muy pocos datos en la literatura sobre la progresión de la válvula aórtica normal a valvulopatía degenerativa. A continuación realizaremos un análisis de la progresión de la valvulopatía aórtica degenerativa.

1.3.1 Progresión de válvula normal a esclerosis aórtica

Dos trabajos prospectivos han examinado la progresión de una válvula aórtica normal hacia la valvulopatía. Sverdlov AL et al ¹⁷ examinaron los datos de 203 pacientes estudio observacional, basado en población general, y que tenían 4 años de seguimiento ecocardiográfico. De todos ellos, el 24% de los pacientes incluidos desarrollaron esclerosis aórtica. Novaro GM et al ¹⁸ analizaron 5621 participantes en estudio observacional multicéntrico, basado en población general, y con edades superiores a los 65 años. De todos los participantes con válvula aórtica sana (n=3917), el 44% desarrollaron esclerosis aórtica en un seguimiento medio de 5 años.

1.3.2 Progresión de esclerosis a estenosis aórtica

Un trabajo prospectivo y dos trabajos retrospectivo han analizado la progresión de la patología aórtica. Novaro GM et al ¹⁸ en el estudio observacional multicéntrico, basado en población general, y con edades superiores a los 65 años, analizaron 1610 pacientes con esclerosis aórtica. De todos los pacientes analizados, el 9% desarrollaron estenosis aórtica en un seguimiento medio de 5 años. Hubo 1% de pacientes que desarrollaron estenosis aórtica, y no presentaban antecedentes de esclerosis aórtica en el momento inicial del estudio. Faggiano et al ¹⁹ analizaron 400 pacientes con esclerosis aórtica en el estudio basal de forma retrospectiva. El 33% de los pacientes desarrollaron estenosis aórtica en un seguimiento medio de 4 años: el 25% estenosis leve, el 5% estenosis moderada y el 3% estenosis grave. Cosmi et al ¹⁷ examinaron los datos de 2131 pacientes con esclerosis aórtica que tenían por lo menos un año de seguimiento ecocardiográfico también de forma retrospectiva. De todos ellos, el 16% de los pacientes incluidos desarrollaron algún tipo de estenosis aórtica: el 10.5% de los pacientes desarrollaron estenosis aórtica leve, el 2.9%

estenosis moderada, y el 2.5% estenosis grave, durante una media de seguimiento de 7.4 años. Cabe destacar que, todos los pacientes con estenosis aórtica excepto uno, presentaron como antecedente esclerosis aórtica.

Aunque estos hallazgos han establecido que la esclerosis aórtica puede progresar a estenosis aórtica, no establecen la tasa de progresión de la esclerosis.

1.3.3 Progresión de la estenosis aórtica

En la Tabla 4 se expone un resumen de los resultados de artículos que han examinado la progresión de la estenosis aórtica. En los trabajos más antiguos, las observaciones se basaban en datos hemodinámicos procedentes de estudios realizados durante un cateterismo ^{20,21,22,23}. Mientras que en estudios más recientes estos parámetros se realizaron mediante ecocardiografía ^{24,25, 26,27,28,29}. Únicamente cuatro de estos trabajos se realizaron de forma prospectiva ^{7,25,26,27}.

Tabla 4.- Resumen trabajos sobre la progresión de la estenosis aórtica.

Autor	Método diagnóstico	n	Edad media	Aumento del gradiente medio (mmHg/año)	Descenso área aórtica (cm ² /año)
Davies SW et al ²¹	Cateterismo	65	54	6.5	ND
Cheitlin et al ²²	Cateterismo	29	45	7.6	ND
Nitta et al ²³	Cateterismo	11	ND	7.7	ND
Wagner S et al ²⁰	Cateterismo	50	54	5.4	ND
Otto CM et al ²⁵	Ecocardiografía	123	63	7.0	0.12
Iivanainen AM et al ²⁶	Ecocardiografía	333	81	ND	0.06
Otto CM et al ²⁸	Ecocardiografía	42	66	8.0	0.10
Bahler et al ²⁹	Ecocardiografía	91	68	4.9	0.08
Eveborn GW ⁷	Ecocardiografía	118	ND	3.2	ND
Palta S et al ²⁴	Ecocardiografía	170	71	7.0	0.10
Bellamy MF et al ²⁷	Ecocardiografía	156	77	5.3	0.09
Rossebo AB et al ³⁰	Ecocardiografía	1873	67	2.8	0.03
Cowell SJ et al ³¹	Ecocardiografía	155	68	6.6	0.08
Chan KL et al ³²	Ecocardiografía	269	58	3.9	0.08

La disminución del área valvular aórtico y el aumento del gradiente aórtico fue bastante similar en los diferentes estudios. La media de progresión fue de 0.1 cm² al año y 6 mmHg al año, respectivamente, a pesar de las diferencias en el diseño de los trabajos, los gradientes aórticos basales, y la duración del seguimiento. Cabe destacar el trabajo de Rossebø et al ³⁰ por la baja progresión de la valvulopatía. No obstante se trata de un ensayo aleatorizado que no representa a todos los pacientes con estenosis aórtica, ya que pacientes de alto riesgo fueron excluidos a participar (Pacientes con dislipemia que requieran tratamiento farmacológico; pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica, o ictus isquémico; pacientes con diabetes mellitus). Este factor podría explicar la baja tasa de progresión de la estenosis aórtica.

Hay una gran variabilidad en la literatura sobre los marcadores de progresión de la valvulopatía degenerativa. Los marcadores que han sido citados con más frecuencia fueron la edad, el sexo masculino, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, el índice de masa corporal, valvulopatía aórtica más avanzada, y la presencia de calcio en la válvula en el estudio basal ^{7,16,18, 20,21,26,27,33,34,35}.

También existe una gran variabilidad en la tasa de progresión de la estenosis aórtica entre los pacientes ¹⁶. A raíz de estos resultados, se consideran progresores lentos de estenosis aórtica aquellos pacientes con disminución del área valvular < 0.05 cm² y/o incremento en la velocidad máxima aórtica < 0.15 m/s, y progresores rápidos aquellos pacientes que presentaban una disminución en el área valvular aórtico > 0.05 cm² y/o incremento en la velocidad máxima aórtica > 0.15 m/s, en un período medio de 6 meses ^{36,37}.

En los últimos años varios los trabajos han intentado identificar los marcadores de progresión rápida de la estenosis aórtica, pero existe gran discrepancia entre los diferentes trabajos. Palta et al ²⁴ encontraron que el área aórtica inicial, el tabaquismo, y los niveles séricos de calcio se relacionaban con una progresión más rápida en 170 pacientes a los que se había realizado un seguimiento ecocardiográfico. En el trabajo de Novaro et al ³⁸, los predictores de una mayor progresión fueron la edad, y no encontrarse en tratamiento con estatinas. Bellamy et al ²⁷ también demostraron que una asociación entre el empleo de las estatinas y una disminución en la progresión de la estenosis aórtica, pero no encontró ninguna correlación entre la progresión de la estenosis aórtica y los niveles de colesterol. En el trabajo de Sánchez et al ³⁶, realizado de forma prospectiva en 43 pacientes, únicamente se observó una mayor concentración de proteína C reactiva (PCR) en los

progresores rápidos, pero no hubo ninguna asociación con factores de riesgo clásicos, perfil lipídico, y concentración de calcio. En cambio, en el trabajo de Gómez M et al ³⁷, con 174 pacientes y también realizado de forma prospectiva, sólo encontró una asociación con una progresión más rápida con los niveles séricos de LDL oxidado, y no con los niveles de PCR, de calcitonina, de hormona paratiroidea, de calcio, de fósforo, y la función renal.

1.4 Pronóstico

1.4.1 Morbilidad

Los pacientes con alteraciones en la válvula aórtica presentan un mayor riesgo de eventos cardiovasculares y/o muerte de origen cardiovascular, en comparación con personas con válvulas aórticas normales. Esta peor evolución era bien conocida desde hace décadas en el caso de la los pacientes con obstrucción en el tracto de salida (estenosis aórtica) ³⁹. En cambio, la esclerosis aórtica era considerada un proceso benigno. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las personas con grados leves de engrosamiento valvular y calcificación (esclerosis aórtica) también presentan una peor evolución.

En el Estudio de la Salud Cardiovascular ¹¹, un importante trabajo que realizó un seguimiento medio de 5 años a 5621 pacientes, demostró que la presencia de esclerosis aórtica se asoció de forma independiente con un aumento del riesgo de padecer un infarto de miocardio (RR1.40 (1.07-1.83)), y también un aumento aproximado del 50% de desarrollar insuficiencia cardiaca (RR 1.28 (1.01-1.63)). Los pacientes con estenosis aórtica, independiente del grado de severidad, presentaron con mayor frecuencia infarto de miocardio (11% vs 16), angina de pecho (24% vs 11%), insuficiencia cardiaca (25% vs 9%), y accidentes cerebrovasculares (12% vs 6%) que los paciente con válvulas normales.

1.4.2 Mortalidad

Los pacientes con esclerosis aórtica también presentan un peor pronóstico en comparación con las personas con válvulas aórticas sanas. En el Estudio de la Salud Cardiovascular ¹¹, la tasa de muerte por cada 1000 personas/año, tanto producida por cualquier causa (37 vs 19), como la de origen cardiovascular resultó dos veces mayor en los pacientes con esclerosis aórtica (14 vs 6). En el análisis de supervivencia de Cox, una vez ajustado con la edad, el sexo y los factores de riesgo cardiovascular, el riesgo relativo de muerte de cualquier causa en pacientes con esclerosis aórtica fue de 1.35 (Intervalo de confianza (IC) del 95%: 1.12-1.61), mientras que el riesgo relativo de muerte de origen cardiovascular fue de 1.52 (IC del 95%: 1.12-2.05).

Otro trabajo importante fue el realizado por Aronow et al ¹², en el que analizó de forma retrospectiva a 2358 pacientes, y comparó el pronóstico de los pacientes con esclerosis aórtica con los pacientes con válvulas aórticas sanas. Los pacientes con esclerosis tenían cerca del doble de riesgo de tener a lo largo del seguimiento un infarto agudo de miocardio, o una muerte súbita (RR 1.8 (1.5-2.031)). Este hallazgo se confirmó en otro trabajo más reciente, y en el que, además, se comprobó que este riesgo superior fue independiente de la presencia de factores de riesgo cardiovascular o de cardiopatía isquémica. El riesgo resultaba todavía mayor en los pacientes con edades superiores a los 66 años ⁴⁰.

El paciente asintomático con estenosis aórtica grave tiene un excelente pronóstico a pesar de obstrucción grave del flujo ventricular izquierdo. Esta afirmación se basa en observaciones de las décadas de los 60, 70, y 80, por lo que estos pacientes podrían ser seguidos clínicamente, ya que su pronóstico sería similar al pronóstico de la población general ³⁹. Sin embargo, la supervivencia de estos pacientes no es óptima, porque se ha descrito que existe un pequeño riesgo de muerte súbita ^{39,41,42}. El concepto de benignidad de la estenosis aórtica grave asintomática ha sido refutado en los últimos años, básicamente apoyado en dos premisas:

1. No siempre el paciente asintomático está realmente libre de síntomas. Muchas veces procuran limitar progresivamente sus actividades, enmascarando síntomas; son en la realidad “pseudo-asintomáticos”, y, de esta forma, tiene peor pronóstico.

2. Los pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos no son idénticos. Existen otras variables que pueden aumentar o disminuir el riesgo de estos pacientes, de manera que, aunque parte de un mismo grupo, en realidad son un grupo heterogéneo de pacientes.

Por lo que el manejo del paciente con estenosis aórtica grave asintomático ha sido en los últimos años, y es en la actualidad un importante tema de debate. La estrategia de operar anticipadamente a todos los pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos no es viable. Imaginando que la “cirugía anticipada” fuese la rutina, estaríamos exponiendo 100% de los pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos a un riesgo de 3% a 4% relacionado al procedimiento quirúrgico, sumado a un riesgo de 1% al año relacionado a la presencia de prótesis valvular. En comparación con el beneficio de prevenir aproximadamente el 1% de esta población que tendría el riesgo de muerte súbita por año ^{4,42}. Por otro lado, mantener todos los pacientes de ese grupo en observación clínica puede no ser seguro ^{25,43}. Lo que se ha

buscado, por lo tanto, es la estratificación más refinada de ese grupo de pacientes, con el objetivo de identificar aquellos pacientes de mayor riesgo, que se beneficiarían de la cirugía. Con este propósito, y basado en directrices y estudios observacionales más recientes, los principales factores de riesgo serían ⁴⁴:

1. Prueba de esfuerzo positiva (con síntomas o hipotensión al esfuerzo).
2. Área valvular aórtica menor o igual a $0,7 \text{ cm}^2$ o área valvular indexada menor o igual a $0,4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$.
3. Velocidad de flujo transvalvular aórtico rápidamente progresiva, con tasa de aumento anual mayor que $0,30 \text{ m/s}$ al año.
4. Calcificación valvular aórtica moderada-intensa si se asocia a rápido aumento de la velocidad de flujo transvalvular aórtico.
5. Hipertrofia ventricular excesiva, otro marcador de gravedad, especialmente si es sumada al área valvular reducida.

Sin embargo, cuando los pacientes con estenosis aórtica grave comienzan a desarrollar síntomas, no hay dudas sobre la reducción en su supervivencia. Ésta se encuentra perfectamente analizada según las manifestaciones que presente: de este modo, el 50% de los pacientes con estenosis aórtica grave que presente angina de pecho sobrevivirán a los cinco años; mientras que se reduce la supervivencia al 50% a los tres años de los que presenten síncope; y el 50% de supervivencia a los dos años de los que desarrollen insuficiencia cardíaca ³⁹ (**Figura 1**).

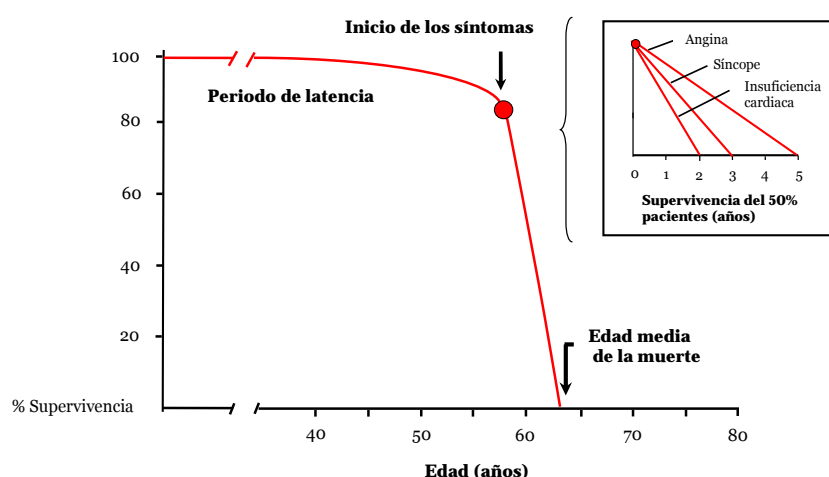


Figura 1.-Supervivencia de pacientes con estenosis aórtica grave en función de los síntomas ⁷⁶.

1.5 Lesión característica de la valvulopatía aórtica degenerativa

1.5.1 Válvula aórtica normal

La válvula aórtica es una válvula semilunar, con forma de nido de golondrina, y consta de tres velos, uno anterior y dos posteriores o coronarios.

Cada velo se divide en tres capas: La capa ventricular se encuentra constituida principalmente por fibras de elastina, que están alineadas en dirección radial, de forma que se sitúan en sentido perpendicular al borde del velo. La capa fibrosa se encuentra en el lado aórtico del velo, está constituida fundamentalmente de fibroblastos y fibras de colágeno organizadas en sentido paralelo al borde del velo, esto es, en forma de circunferencias. La esponjosa es una capa de tejido conectivo laxo en la base del velo, separa la capa ventricular y la fibrosa, y está compuesta de fibroblastos, células mesenquimales, y una matriz extracelular rica en mucopolisacáridos. Las capas fibrosa y ventricular se encuentran recubiertas de una capa de células endoteliales. El conjunto de capas, tanto sus componentes como su distribución espacial, proporcionan a los velos de la válvula la resistencia y la flexibilidad necesaria para resistir décadas de movimiento repetitivo ⁴⁵.

1.5.2 Valvulopatía aórtica degenerativa

La estenosis aórtica fue descrita por Mönckeborg en 1904 ⁴⁶. Desde el punto de vista macroscópico, la estenosis aórtica se caracteriza por un engrosamiento y una gran calcificación distrófica de los velos, que provoca un aumento en la rigidez de la válvula, y, finalmente, una obstrucción del flujo de salida del ventrículo izquierdo.

Esta alteración de la válvula aórtica se localiza en un primer momento en el lado aórtico de la válvula, y en las bases de los velos, que es precisamente el lugar de la válvula donde más estrés mecánico se produce, por el continuo movimiento de apertura y cierre de los velos. Estas observaciones dieron lugar a la hipótesis que la estenosis aórtica era el resultado del desgaste natural que provocaba el estrés mecánico, y, por lo tanto, no se podía modificar su evolución natural ⁴⁷.

Sin embargo, en la década de los 80 aparecen una gran diversidad de trabajos que desechan que la degeneración valvular sea un mecanismo pasivo relacionado exclusivamente con la edad. Por el contrario las importantes asociaciones entre factores de riesgo clásicos de aterosclerosis y la valvulopatía aórtica hacen que hoy en día entendamos el proceso degenerativo como un mecanismo activo similar a la aterosclerosis. El trabajo realizado por Stewart et al ¹⁶, mayor trabajo prospectivo en relación con este tema, en el que incluyeron a 5201 pacientes con edad >65 años, demostró que la edad, el sexo masculino, los antecedentes de hipertensión arterial, y niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteína (a) se asociaban de forma positiva con la valvulopatía aórtica. Peltier et al ⁴⁸ realizaron también un estudio prospectivo, en el que incluyeron a 220 pacientes consecutivos con estenosis aórtica severa trivalva calcificada que iban a ser intervenidos quirúrgicamente. Como controles incluyeron a 220 pacientes emparejados por edad y sexo que iban a ser intervenidos de insuficiencia aórtica. Demostraron que los niveles de colesterol elevados, la hipertensión, el tabaco, y un índice de masa corporal elevado se asociaban con la estenosis aórtica de forma independiente.

Fue en la década de los 90 cuando se describió por primera vez la lesión de la valvulopatía degenerativa. Ésta lesión se caracterizaba por una discontinuidad en la membrana basal del endotelio, a través de la cual se depositan lípidos, proteínas, se infiltran células, y se produce una mineralización extracelular, lo que llevaba a un engrosamiento del subendotelio. Como consecuencia, se observa un desplazamiento de la lámina elástica subendotelial. La capa fibrosa, en la zona adyacente a la lesión, también está alterada. Los principales componentes celulares son células inflamatorias, principalmente macrófagos y células espumosas, y linfocitos T. En cambio, las células musculares lisas y los miofibroblastos son infrecuentes. Cabe destacar que las células inflamatorias se encuentran en la superficie de la lesión, mientras que la región calcificada aparece en la zona más profunda de la lesión, lo que confirma el proceso patológico activo, mediado por un gran número de citocinas inflamatorias, y con sucesivas etapas de progresión de la enfermedad ⁴⁹ (**Figura 2**).

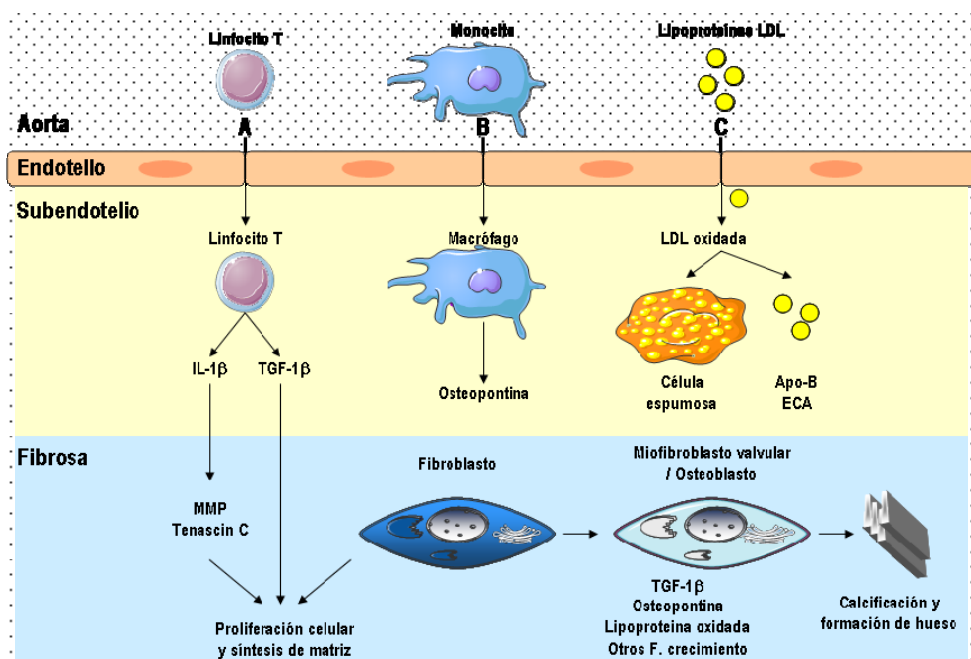


Figura 2.- Resumen de la teoría etiopatogénica de la estenosis aórtica degenerativa.

Por lo tanto, la fisiopatología de la valvulopatía aórtica degenerativa es un proceso patológico activo en el que, como veremos a continuación, participan muchos mecanismos patogénicos. Un mejor conocimiento de estos procesos podría llevar al desarrollo de un conjunto de tratamientos capaces de modificar la evolución de esta enfermedad.

1.6 Mecanismos fisiopatológicos de la valvulopatía aórtica degenerativa

1.6.1 Factores genéticos

La genética podría tener un papel importante en el riesgo y desarrollo de la valvulopatía aórtica.

Recientemente, se han publicado una serie de artículos en los que determinados polimorfismos genéticos se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar estenosis aórtica. Un alelo específico del receptor de la vitamina D (BsmI/b), que produce una menor absorción ósea y una mayor pérdida de calcio con la edad, fue más frecuente en pacientes con valvulopatía aórtica en comparación con los controles ⁵⁰. La combinación de polimorfismos de un receptor específico de estrógeno α (PvuII) y TGF β 1 se han asociado con un mayor riesgo de estenosis en mujeres postmenopáusicas ⁵¹. Finalmente, ciertos polimorfismos del gen de la interleucina (IL) 10 se asociaron con la extensión del contenido de calcio en las válvulas aórtica ⁵². Otros trabajos han demostrado que diferentes polimorfismos/mutaciones en el gen de la proteína 5 relacionada con el receptor de LDL (Lrp5), se asociaban con un fenotipo osteoporótico, y también podrían desempeñar un papel importante en la desarrollo de calcificaciones vasculares y valvulares ^{53,54,55}.

La genética proporciona, además, una unión con la fisiopatología de la calcificación. El factor transcripcional NOTCH 1 regula el desarrollo embrionario de la válvula aórtica, así como la diferenciación osteogénica de los fibroblastos valvulares; actúa como un importante inhibidor de Runx2/Cbfa 1, que es una vía con un notable papel en la actividad de los osteoblastos. Las mutaciones funcionales en el gen podrían aumentar la diferenciación osteoblástica y podrían mediar en la mayor propensión de la calcificación valvular. Las mutaciones de dicho factor se encontraron en 2 familias que presentan alteraciones valvulares y calcificación aórtica importante ⁵⁶.

No obstante, todavía son escasos los datos en la actualidad en relación con la genética y la valvulopatía aórtica. Con las nuevas técnicas de multisequenciación que permiten estudiar un gran número de genes de forma rápida y segura, se podría abrir un campo de investigación importante.

1.6.2 Factores iniciales

La calcificación del velo valvular ocurre inicialmente en el lado aórtico de los velos, donde el flujo es más turbulento, lo que sugiere que el estrés de dicho flujo es fundamental como factor inicial de la lesión ⁴⁵. Esta hipótesis se comprobó mediante la expresión del factor *Krüpel-like 2* (FKL 2) en las células endoteliales. El factor FKL 2 es un indicador del tipo de flujo ⁵⁷, que se encuentra reducido en las zonas de flujo turbulento. Se observó una reducción en la expresión de FKL 2 en el lado aórtico de los velos, en comparación con el lado ventricular ⁵⁸. Probablemente, las lesiones aórticas comenzarían por una activación de las células endoteliales secundaria al flujo turbulento, lo que favorecería la rotura en la integridad de la capa endotelial de manera parecida a lo que ocurre en las lesiones ateroscleróticas.

No obstante, es necesaria la implicación de más mecanismos en la patogenia porque, bajo condiciones fisiológicas, la capa endotelial se mantiene intacta después de un daño en el endotelio. Por tanto, los mecanismos comprometidos podrían estar relacionados con la reparación de la capa endotelial; la división de células endoteliales maduras; o la renovación con células madre circulantes.

La capacidad de regeneración de las células endoteliales maduras es limitada ⁵⁸. Las células somáticas que alcanzan una determinada edad, entran en una fase senescente, es decir, en un estado de no replicación ⁵⁹. Recientemente Kurtz et al ⁶⁰ describieron que el acortamiento de los telómeros se asociaba con la presencia de la valvulopatía aórtica. De manera que las válvulas aórticas enfermas tendrían mayor número de células senescentes, con acortamiento de los telómeros, porque las células endoteliales valvulares se encuentran en continuo recambio celular por el aumento del estrés.

Otro mecanismo de reparación endotelial es el realizado por las células madre endoteliales circulantes. Se ha observado que el número de dichas células madre se

encontraba francamente reducido en los pacientes con estenosis aórtica en comparación con los controles ⁵⁸.

1.6.3 Función endotelial

La superficie de la válvula se encuentra recubierta con células endoteliales, que tienen un papel fundamental en el correcto funcionamiento de la válvula. Como acabamos de comprobar, las células endoteliales aórticas se encuentran expuestas de forma crónica a complejas fuerzas de flujo, que ocasionan un daño endotelial. Como consecuencia se activaría la célula endotelial, y se incrementaría la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, se favorecería el estrés oxidativo, y se reduciría la capacidad de la liberación de óxido nítrico (NO) ⁶¹.

Las células endoteliales activadas expresan de forma más marcada moléculas de adhesión de leucocitos (ICAM 1 y VCAM 1), factor von Willebrand, y molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM 1). Se ha demostrado un incremento de marcadores de activación endotelial en las válvulas aórticas con estenosis, en comparación con las válvulas normales. Los pacientes con valvulopatía aórtica también presentaban niveles plasmáticos aumentados de E selectina, que se normalizaban con la cirugía valvular ⁶².

Hemos visto que en las células endoteliales de las válvulas aórticas enfermas se producía una reducción en la expresión de FKL-2. El papel del factor de FKL-2 es muy importante porque controla un gran número de procesos: regula la adhesión leucocitaria, inhibe la activación celular de determinados estímulos proinflamatorios, y regula la función antitrombótica endotelial ⁶³.

Otra propiedad del endotelio valvular es que, en condiciones fisiológicas, modula las propiedades mecánicas de las cúspides aórticas, mediante la liberación de NO, que produce relajación, y la endotelina (ET) 1, que produce contracción en los miofibroblastos. Los cambios en la elasticidad pueden optimizar el estrés de la válvula mediante la distribución perfecta por su superficie y así evitar microtraumas.

Por tanto, el papel del endotelio es crucial para la función de la válvula y el impacto de la duración de las válvulas ^{64,65}.

1.6.4 Mecanismos inflamatorios

En 1994 varios trabajos describieron por primera vez la presencia de células inflamatorias en las lesiones valvulares aórticas. En un primer momento, únicamente se caracterizó la presencia de macrófagos y linfocitos T^{49,66,67}. Los monocitos infiltran la capa endotelial mediante la unión con las moléculas de adhesión de la células endoteliales (ICAM 1 y VCAM 1), y, posteriormente, se diferencian en macrófagos. Los macrófagos contribuyen a aumentar el estrés oxidativo, y a liberar citocinas proinflamatorias⁶². Los linfocitos T que se encuentran en el subendotelio y en la fibrosa también liberan citocinas proinflamatorias, como la interleucina II, el factor de necrosis tumoral (TNF) α , el factor de transformación del crecimiento (TGF) β 1, y IL 1 β ⁶⁸.

De forma más reciente, también se ha descrito la presencia de mastocitos en la lesión valvular, sobre todo en la proximidad de las zonas de calcificación de la válvula^{69,70}. Los mastocitos liberan una gran cantidad de citocinas proinflamatorias y enzimas, entre las que destaca la catepsina G. Esta enzima se encuentra aumentada en las válvulas aórticas enfermas, tiene una función lítica de la elastina, y también contribuye al remodelado de la matriz extracelular⁷⁰.

También se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias liberadas en la lesión contribuyen a un aumento en la producción de metaloproteinas (MMPs) de la matriz. Las MMPs producen un remodelado de la matriz extracelular, como veremos en el apartado 7. También pueden producir cambios osteoblásticos en las células intersticiales y, por tanto, favorecer la calcificación valvular⁷¹. Uno de los mecanismos por los que las células intersticiales responden al estímulo proinflamatorio podrían ser los receptores Toll-like (TLR) 2 y 4, que son receptores capaces de regular la respuesta celular inflamatoria. Las células intersticiales de la válvula aórtica presentan una gran cantidad de TLR 2 y 4, y estudios in vitro han demostrado que son funcionales. La activación de los TLR en las células intersticiales valvulares produciría una liberación de moléculas de adhesión y citocinas

proinflamatorias (ICAM 1; IL 6 y 8), que tendrían un papel de retroalimentación de la cascada inflamatoria, y un incremento de moléculas osteoblásticas (BMP2 y Runx2) ⁷², lo que supone una unión entre la inflamación y la calcificación en la valvulopatía aórtica.

Además, existen otros marcadores que resaltan el papel de la inflamación en la fisiopatología de esta enfermedad. La PCR, el marcador inflamatorio más empleado en la cardiopatía isquémica, también se encuentra aumentado en los pacientes con estenosis aórtica ³⁶.

1.6.5 Metabolismo lipídico

Las alteraciones del metabolismo lipídico siempre se han relacionado con la valvulopatía aórtica ^{16,24,48,73}.

En la fase inicial de la lesión aórtica valvular se ha observado un depósito de lípidos focal y extracelular en varias zonas de la región subendotelial. En las zonas ricas en lípidos también se encontraban presentes las apolipoproteínas B, a, y E, lo que implicaría que estos lípidos derivarían de las lipoproteínas plasmáticas. Esta hipótesis se ha comprobado mediante un modelo experimental animal, en el que la cantidad de colesterol depositado en la válvula aórtica se incrementa en relación con una mayor cantidad de lípidos en la dieta ⁹.

También se identificaron una gran cantidad de moléculas de LDL oxidadas en las lesiones valvulares aórticas, principalmente en las zonas de calcificación. El aumento de la presencia de moléculas de LDLs oxidadas se produce como consecuencia de la activación endotelial y las células inflamatorias. Estas moléculas son captadas por los macrófagos y se convierten en células espumosas similares a las de la aterosclerosis ⁷⁴, También se ha demostrado mediante estudios in vitro que las LDL oxidadas estimulan la formación de núcleos de calcificación ².

Además, las válvulas aórticas enfermas tienen mayor nivel de Lpr 5 ⁴⁴. Esta proteína se activa por niveles elevados de LDL, y se ha descrito relacionada con el proceso de diferenciación de los miofibroblastos a osteoblastos ⁷⁵.

1.6.6 Péptidos natriuréticos

El sistema renina-angiotensina también ha sido relacionado con la patogénesis de la lesión valvular aórtica ^{70,76}.

En una gran proporción de la lesión valvular se ha podido encontrar enzima convertidora de angiotensina (ACE) asociada a LDL en la matriz extracelular. La angiotensina II también se localizaba en estas zonas, lo que sugiere que la asociación de LDL y enzima convertidora de angiotensina (ECA) tiene propiedades enzimáticas ⁷⁶. Los mastocitos que, como ya hemos comentado con anterioridad se encuentran presentes en la lesión valvular, contienen quimasa, una enzima distinta a ECA que puede generar angiotensina II ⁷⁰. La catepsina G, una proteasa derivada de los mastocitos activados, también es una importante fuente de angiotensina II, y se ha comprobado que su expresión es significativamente mayor en las válvulas aórticas estenóticas ⁷⁷. De este modo en la lesión aórtica existen una serie de fuentes potenciales de angiotensina II.

La angiotensina II, a través de su receptor AT₁, tiene un gran número de efectos promotores de la lesión valvular, entre los que se incluyen la estimulación de la inflamación, y el depósito de colesterol en los macrófagos. Finalmente, se produciría un aumento del estrés oxidativo, y estimularía la captación de lipoproteínas en los fibroblastos valvulares ^{78,79}.

1.6.7 Calcificación valvular

La calcificación de la válvula es la característica principal de la valvulopatía aórtica. Se trata de un proceso activo que se encuentra presente desde las fases iniciales de la lesión, y es uno de los principales determinantes de la rigidez de los velos en la estenosis aórtica. La calcificación está formada por hidroxiapatito, que es la forma de mineral de calcio y fósforo presente en el hueso ⁴⁵.

Las zonas microscópicas de calcificación de la esclerosis aórtica, como hemos descrito previamente, se asociaron con el depósito de lipoproteínas y la infiltración de las células inflamatorias. Las proteínas que se han relacionado con la regulación de la calcificación son la osteopontina, la osteocalcina, proteínas formadoras de

hueso (BMPs) 2 y 4⁶⁹, la osteoprotegerina, el ligando activador del receptor nuclear NF- κ B (RANKL)^{69,80,81}. Las partículas de LDL oxidado, RANKL, TGF B1, TNF α aumentan la expresión de los marcadores osteoblásticos de las células intersticiales; y también estimulan a las células intersticiales de las válvulas, de manera que liberan vesículas a la matriz extracelular, producirían un serie de cambios en la matriz, que favorecerían su calcificación^{9,82}.

El RANKL en las lesiones aórticas se ha descrito que está aumentado, mientras que su inhibidor, la osteoprotegerina, está reducido. La estimulación de RANKL promueve la calcificación valvular mediante un aumento en la actividad de MMP 1 y 2, en la expresión de osteocalcina, y en la actividad del factor Cbfa1^{83,84}.

Además, la tenascina C, una glicoproteína de la matriz extracelular implicada en la estimulación de formación y mineralización de hueso, se ha descrito asociada a MMP2 en los velos calcificados de la válvula aórtica, y se ha relacionado con la progresión de la enfermedad^{85,86}.

A medida que la enfermedad progresa, se observa una formación activa de tejido óseo. En las válvulas que presentan tejido óseo, había expresión de factores que promovían la osteogénesis, como las BMPs 2 y 4. Los factores aterogénicos, entre los que se incluyen LDL oxidado, TNF α , e hiperglucemia, pueden mediar en la calcificación, al menos en parte, a través de la vía activada por el BMP 2².

La BMP 2 se ha descrito en las lesiones valvulares, y estimula formación de nódulos de calcificación en cultivos de fibroblastos⁸⁷. La BMP 2 puede incrementar la regulación osteogénica de las células intersticiales a través de dos mecanismos de acción: vía factor de transcripción Msx2, y vía factor de transcripción Runx2/Cbfa1.

Una expresión excesiva de Msx2 en ratones favorecía la calcificación valvular a través de una vía osteogénica, y se relacionaba con la activación del receptor Wnt⁸⁷. Este receptor se encontraba relacionado con la Lpr 5, lo que supone un nexo de unión entre el metabolismo lipídico y la calcificación.

La BMP 2 también puede activar la calcificación valvular mediante la vía condro-osteogénica a través del factor Runx2/Cbfa1. Este factor favorece la diferenciación osteoblástica de los miofibroblastos, y es un paso crucial en el proceso de calcificación vascular ya que es el paso final de numerosos estímulos. Se ha demostrado que esta vía se encuentra aumentada en conejos con dieta hiperlipídica^{9,73,88}. El gen NOTCH1, mencionado previamente, es un factor de transcripción que en

condiciones normales inhibe a Runx2/Cbfa1². El fosfato también favorece la calcificación mediante esta vía, y está mediado por el cotransportador Pit1 de fosfato^{70,89}.

1.7 Comparación de la fisiopatología de la valvulopatía aórtica y de la aterosclerosis

Como hemos podido comprobar, la valvulopatía aórtica degenerativa comparte muchas características con la aterosclerosis coronaria. De hecho, se ha sugerido que ambas enfermedades son la misma manifestación. En ambas patologías, la lesión inicial se caracteriza por una rotura de la membrana basal del endotelio, y ésta se produce en zonas donde hay un flujo turbulento y gran estrés tensional ^{90,91}.

Además, presentan factores de riesgo clínicos comunes, entre los que se encuentran la edad, la hipertensión, y la dislipemia ^{27,38,92,93,94,95}. Incluso la patogenia de las lesiones es muy semejante. Se produce un depósito de lípidos en el subendotelio, existe una participación de macrófagos y linfocitos T ^{9,56,70,90}, la inflamación posterior origina una liberación de citocinas y la activación de los miofibroblastos, y finalmente, se produce una gran expresión de proteínas activas en la matriz extracelular.

No obstante, a pesar de tener una fisiopatología tan similar, la prevalencia de arteriosclerosis en valvulopatía aórtica es del 40-50%, y el porcentaje de pacientes con cardiopatía isquémica que tienen valvulopatía aórtica significativa es muy reducido ^{5,16,96}. Incluso en un trabajo se ha comprobado que la coronariopatía no se asocia de forma independiente con la valvulopatía aórtica ⁴⁸. Desde un punto de vista clínico, aunque muchos trabajos han documentado un solapamiento de factores clínicos asociados a ambas enfermedades, existen ciertos factores que se asocian de forma convencional con la valvulopatía aórtica, como puede ser el género y la diabetes, que no tienen una asociación tan fuerte como en la aterosclerosis ⁴⁵.

El tipo celular predominante en las lesiones valvulares son las células intersticiales, que tienen características de miofibroblastos ⁹⁷. En cambio, no existe participación de las células musculares lisas en las lesiones valvulares iniciales, mientras que el papel de este tipo celular en las lesiones ateroscleróticas es muy importante ^{70,98}.

También encontramos diferencias en relación con el papel de las MMPs en la aterosclerosis y la estenosis aórtica: En el caso de la aterosclerosis, las MMPs tienen un papel fundamental en la degradación de la matriz extracelular y, consecuentemente, en la fragilidad de la placa que conlleva la aparición de eventos clínicos. En la valvulopatía aórtica las MMPs también producen una degradación en

la matriz extracelular, pero, en cambio, favorecen la fibrosis y la calcificación de los velos valvulares ^{99,100,101}.

La mineralización microscópica es más prominente, y se desarrolla antes en las lesiones valvulares iniciales en comparación con la lesión típica de la aterosclerosis ^{49,97}. Además, las alteraciones que se observaron en la lesión valvular no quedan confinadas al área donde se implanta la lámina elástica, sino que se extienden hacia la capa de fibrosa adyacente.

Finalmente, el tratamiento con estatinas, fármacos muy eficaces en la aterosclerosis, no han mostrado beneficio en la valvulopatía aórtica ^{30, 31,91,95}.

Por lo anterior expuesto valvulopatía aórtica y aterosclerosis coronaria son, en realidad, dos patologías diferentes.

1.8 Opciones terapéuticas.

1.8.1 Tratamiento farmacológico

A pesar de haberse identificado numerosos mecanismos relacionados con el desarrollo y progresión de la estenosis aórtica que pudiesen potencialmente explorarse como dianas terapéuticas; desde el punto de vista clínico únicamente cuatro grupos farmacológicos han sido evaluados: las estatinas, los IECAs/ARA II, los bisfosfonatos y el bloqueo de la aldosterona.

1.8.1.1 Estatinas

Las estatinas tienen un efecto antiinflamatorio y también conservan la función endotelial tanto en la población general, como en los pacientes con aterosclerosis coronaria ^{102,103}. Por tanto, este mismo efecto podría trasladarse a los pacientes con valvulopatía aórtica ^{104,105,106}. Para constatar esta hipótesis se han realizado un gran número de estudios clínicos, inicialmente retrospectivos y posteriormente prospectivos, que han evaluado la respuesta de la progresión de la estenosis aórtica al tratamiento con estatinas.

La mayoría de los estudios retrospectivos describieron un efecto beneficioso del uso de estatinas capaces de reducir la progresión de la enfermedad. Es importante reseñar que este efecto beneficioso no guardaba relación con los niveles séricos de colesterol ^{35,95,107}, y se atribuía al efecto pleitrópico de las estatinas ¹⁰⁸.

Sin embargo, los estudios clínicos prospectivos no han mostrado beneficio del uso con estatinas. Únicamente en el estudio RAAVE, un trabajo prospectivo sin aleatorización del tratamiento, donde se administró rosuvastatina en función de los niveles de LDL colesterol en sangre, se produjo una reducción en la velocidad de progresión de la enfermedad ¹⁰⁹. En el estudio SALTIRE, estudio prospectivo y aleatorizado con atorvastatina, no hubo diferencias en la disminución de la velocidad del jet aórtico ni en la puntuación de calcio en el TC entre los pacientes tratados con atorvastatina o placebo ³¹. Asimismo, en el estudio ASTRONOMER, también prospectivo y aleatorizado con rosuvastatina, tampoco se observaron diferencias en la

progresión de la estenosis aórtica en pacientes con estenosis aórtica ligera o moderada ³². Finalmente el estudio SEAS, mayor estudio publicado prospectivo y aleatorizado en el que los pacientes recibieron simvastatina/ezetimibe vs placebo, tampoco se encontraron diferencias en la progresión de la valvulopatía ni en la evolución clínica entre el grupo que aleatorizado a tratamiento hipolipemiante en comparación con el grupo control ³⁰.

Es posible que el momento de la valvulopatía aórtica en que se administra la estatina sea importante en la prevención de la progresión de la enfermedad. De hecho hay un trabajo reciente, aunque retrospectivo, que parece avalar esta hipótesis: la mayor eficacia de las estatinas tuvo lugar durante la fase de esclerosis aórtica ^{33,110}.

1.8.1.2 Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAS) / Antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA II)

Se ha detectado en las inmediaciones de la lesión valvular aórtica la presencia de enzima convertidora de angiotensina ^{70,76,111}, y quimasa ⁷⁰. Ambas enzimas se han relacionado con la producción de angiotensina II. Por tanto, IECAs/ARA II son un tipo de fármacos que podrían presentar ciertos efectos beneficiosos en la progresión de la estenosis aórtica.

Modelos animales han mostrado como el olmesartan disminuye los cambios escleróticos e inhibe la diferenciación de los osteoblastos en los velos valvulares ⁸⁸. Del mismo modo el tratamiento con ramipril parece reducir la progresión de la estenosis y se asocia con una disminución en la calcificación valvular, una reducción en la infiltración de los macrófagos, y una mejoría en la función endotelial y en el estrés oxidativo ¹¹².

Sin embargo, los datos clínicos son escasos, y actualmente existe cierta controversia sobre los resultados de los trabajos publicados ^{92,113,114}. En un análisis retrospectivo de 211 pacientes, Rosenhek et al ¹¹³ observaron que la progresión de la estenosis aórtica no se retrasó en los pacientes tratados con IECAs. Por el contrario, O'Brien et al ⁹² observaron de forma retrospectiva, que el tratamiento con IECA se asoció con una reducción del 71% en la progresión de la calcificación de la válvula aórtica, en 123 pacientes con estenosis aórtica a los que se realizó un seguimiento con

tomografía computarizada. También, Wakabayashi et al ¹¹⁴ en un análisis retrospectivo de 194 pacientes, observaron que la progresión de la estenosis aórtica fue menor en los pacientes que se trataban con IECAs; asociación no encontrada con otros antihipertensivos ni con el tratamiento con estatinas.

Hasta la fecha, no hay estudios prospectivos publicados en humanos evaluando los efectos beneficiosos de IECAs/ARA II en la progresión de la estenosis aórtica.

1.8.1.3 Bloqueo de aldosterona

La lesión de la valvulopatía aórtica degenerativa se caracteriza, en las fases iniciales, por el aumento de fibrosis y la inflamación. De manera que, los tratamientos que reducen la fibrosis intersticial podrían tener un efecto favorable sobre la progresión de la enfermedad de la válvula.

Para comprobar esta hipótesis se empleó un bloqueador de los receptores de la aldosterona, la eplerenona, en un modelo animal experimental de valvulopatía aórtica. Los resultados determinaron que la eplerenona reducía los cambios escleróticos en los velos aórticos, así como la expresión de ECA en la valvulopatía aórtica ¹¹⁵.

Sin embargo, y de forma similar a las estatinas, el estudio aleatorizado y doble ciego ZEST ¹¹⁶ realizado en 65 pacientes con estenosis moderada o severa, no mostró diferencia alguna en la tasa de progresión de la estenosis de la válvula, o la masa del ventrículo izquierdo; ni mejora en la función sistólica o diastólica en el ventrículo izquierdo, en relación con la administración de eplerenona.

1.8.1.4 Bisfosfonatos

Los bifosfonatos son un grupo de medicamentos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis, que también pueden inhibir la calcificación vascular ¹¹⁷. Tienen un

mecanismo de acción directo al inducir la apoptosis de los osteoclastos ¹¹⁸, y un mecanismo antiinflamatorio vía inhibición en la síntesis de colesterol ¹¹⁹.

Actualmente existe controversia sobre los resultados de los trabajos publicados ^{120,121,122}. En un análisis retrospectivo de 55 pacientes, Skolnick et al ¹²⁰ observaron que el tratamiento con bisfosfonatos se asoció con una tasa reducida de progresión de la estenosis aórtica. Innasimuthu et al ¹²¹, en otro estudio retrospectivo basado en datos ecocardiográficos de 76 sujetos, presentaron datos contradictorios en la reducción de la progresión de la valvulopatía aórtica en los pacientes tratados con bifosfonatos. Finalmente Aksoy et al ¹²² publicaron un trabajo retrospectivo en una gran población de pacientes con estenosis aórtica ligera-moderada (n=801). Se trata del mayor análisis retrospectivo publicado actualmente, y no encontraron reducción en la progresión de la estenosis aórtica. No obstante son trabajos retrospectivos, con poblaciones diferentes, y en el que importantes factores de confusión podrían estar presentes.

1.8.2 Tratamiento quirúrgico

El único tratamiento de la estenosis aórtica sintomática que hasta hace pocos años había demostrado una mejoría en los síntomas, y un aumento de la supervivencia es el tratamiento quirúrgico ¹²³.

La estenosis aórtica representa en la actualidad la causa más frecuente de recambio valvular ⁹⁶, y la segunda indicación de cirugía cardíaca ². En el registro europeo de valvulopatías, el 47% de los pacientes intervenidos la causa era la estenosis aórtica de válvula nativa ⁵. Incluso en nuestro medio esta prevalencia se incrementaba hasta un 67%, según los datos del registro de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular del año 2007 ¹²⁴.

Las series quirúrgicas recientes presentaban unas tasas de mortalidad de la cirugía valvular aórtica que varían desde un 1%, hasta un 9% en pacientes de alto riesgo. La supervivencia a largo plazo de los pacientes después de la sustitución valvular fue del 80% a los tres años, con una supervivencia corregida por la edad prácticamente normal ¹²³. La morbilidad postoperatoria grave, como por ejemplo el tromboembolismo, las complicaciones hemorrágicas por la anticoagulación, la

disfunción protésica y la endocarditis resultó muy poco frecuente, con una tasa aproximada del 2-3% al año ⁴⁵.

1.8.3 Nuevas opciones terapéuticas

1.8.3.1 Implante de prótesis percutánea (TAVI)

El riesgo de la cirugía puede ser mayor en pacientes de edad avanzada, ya que presentan importantes comorbilidades. En el registro europeo de valvulopatías se confirmó que un 33% de los pacientes con enfermedad valvular severa sintomática no fueron tratados mediante cirugía valvular ⁵. Por tanto, a pesar de los buenos resultados de la cirugía de la válvula, podría haber un papel para las técnicas alternativas menos invasivas en este subgrupo de pacientes.

La valvuloplastia aórtica percutánea se considera un tratamiento paliativo por su limitada eficacia a largo plazo. Sin embargo, el implante de prótesis aórtica percutánea (TAVI) abre una posibilidad terapéutica a este tipo de pacientes. Actualmente es una alternativa basada en la evidencia, y bien establecida frente a la sustitución de la válvula aórtica mediante cirugía abierta. El ensayo PARTNER demostró que, en los pacientes con estenosis aórtica grave que no son candidatos a cirugía, la implantación aórtica de una TAVI reducía significativamente la mortalidad en comparación con el tratamiento estándar, presentando menos hospitalizaciones, y un mejor control de los síntomas ¹²⁵. También se comprobó que, la implantación de una TAVI en una cohorte de pacientes con un elevado riesgo de cirugía convencional, la supervivencia a 1 año de los pacientes tratados percutáneamente era equivalente a la de los tratados con sustitución quirúrgica de la válvula aórtica ¹²⁶. Sin embargo, este método tuvo una incidencia de ictus y complicaciones vasculares mayores superior a la del tratamiento estándar.

Existen dos tipos de bioprótesis percutáneas, y se han descrito tres vías de acceso:

- Anterógrada: La primera válvula percutánea se implantó a través de esta vía de acceso ¹²⁷. Actualmente no se emplea porque los pacientes desarrollan muchos problemas derivados del procedimiento.

- **Retrógrada:** Actualmente es la vía más empleada. La mortalidad intrahospitalaria oscila entre un 6.4% y un 20%, mientras que la mortalidad esperada según el euroscore es del 28% ^{128,129,130}.
- **Vía transapical:** Esta vía de acceso ha sido la última en utilizarse. Es la vía de elección en pacientes con arteriopatía periférica importante y calcificación grave de la aorta. La mortalidad intrahospitalaria es del 14%, mientras que la mortalidad esperada era del 27% ¹³⁰.

1.8.3.2 Células madre

Se han identificado células progenitoras derivadas de médula ósea en la capa fibrosa de los velos de las válvulas estenóticas ⁹³. Además, se ha comprobado que el número de dichas células madre se encuentra francamente reducido en los pacientes con estenosis aórtica en comparación con los controles ^{58, 131}. Por tanto, se ha sugerido que estas células podrían participar como un mecanismo en la reparación tisular.

Por tanto, una hipótesis podría ser que la administración de células madre en pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa podría mejorar la evolución de la lesión, sobre todo en las fases iniciales de la valvulopatía. Sería necesario realizar en un futuro investigaciones que corroboren esta teoría.

2 Las nanopartículas calcificantes

2.1 Definición

Las nanopartículas calcificantes, también denominadas “nanobacterias”, son unas misteriosas partículas de pequeño tamaño, que han provocado una de las mayores controversias en la microbiología moderna ^{132,133}. Fueron descubiertas por primera vez por geólogos, y las describieron como unas partículas esféricas de un tamaño aproximado de 0,1 μm que se encontraban en la superficie de minerales y rocas ¹³⁴. Posteriormente se encontraron estas partículas en sangre humana y bovina ^{135,136}, así como un gran número de medios de cultivos celulares ¹³⁷.

La propiedad de ser cultivadas fue descrita por primera vez por Kajander et al ¹³². En ese trabajo los autores describieron las nanopartículas como una forma indeterminada de vida; que tenían ciertas características en común con las bacterias, pero también presentaban muchas diferencias con las bacterias actualmente conocidas; y era el agente autorreplicante cultivable más pequeño de la Tierra ¹³⁸.

Al principio se denominaron “nanobacterias”, por su comportamiento similar a una batería, a pesar de su pequeño tamaño. En la actualidad se desconoce la naturaleza de estas partículas. Como el término original puede resultar controvertido, utilizaremos el término nanopartículas calcificantes, de acuerdo con su propiedad mineralizante.

2.2 Características de las nanopartículas

El tamaño de estas nanopartículas oscila entre 20 y 500 nm, las partículas más pequeñas atraviesan los filtros de 100 nm. Han sido identificadas de forma grosera por la tinción de von Kossa para la calcificación. Se observaron mediante el microscopio electrónico de barrido y de transmisión, donde tenían una apariencia semejante a esferas o cilindros ¹³⁸. Presentaban a su alrededor una capa de carbonato apatito, que se forma a partir de los componentes solubles de calcio y fósforo del medio.

También presentaron una reacción con el ADN con la tinción de Hoechst. Inicialmente se describió una secuenciación de 16S rARN, por lo que se habían asignado provisionalmente en el subgrupo alfa-2 de las Proteobacterias. Pero, se comprobó posteriormente que las secuencias de 16S rARN descritas con anterioridad eran virtualmente idénticos al 16S rARN de *Phyllobacterium myrsinacearum*, un microorganismo identificado como una fuente de contaminación de 16S rARN en los estudios de reacción en cadena de la polimerasa ¹³⁹.

Prácticamente se desconoce el metabolismo de las nanopartículas. Se ha descrito que su tasa de duplicación se encontraba entre 2 y 5 días, basándose en el aumento de la densidad óptica, o en el incremento de la masa mineral ¹³⁸. Las nanopartículas eran inalterables, se teñían con dificultad, y eran muy resistentes al calor ^{140,141}. Dosis altas de radiación γ , o ciertos antibióticos, como los aminoglicósidos y las tetraciclinas, inhibieron su crecimiento ^{132,142}.

Presentaron capacidad citotóxica cuando se cultivaron las nanopartículas con células eucariotas, tanto de forma directa ¹⁴³, como de forma indirecta, ya que fueron capaces de provocar una respuesta inmunitaria específica ^{132,137,144}.

La característica fundamental de las nanopartículas es que tienen la capacidad de formar cristales de carbonato con concentraciones fisiológicas de calcio y de fósforo. En la actualidad se desconocen los mecanismos por los que se produce esta calcificación ¹³⁶.

2.3 Controversia de la naturaleza de las nanopartículas

Inicialmente se denominaron “nanobacterias” porque se creía que era un organismo vivo y por su pequeño tamaño. Esta terminología favoreció una búsqueda activa de ácidos nucleicos (ARN/ADN). Actualmente, no se ha aislado DNA o RNA de estas partículas con los procedimientos habituales ^{145,146}, y existe una gran controversia sobre su naturaleza.

Hay grupos que descartan que sean organismos vivos por su pequeño tamaño. Manilof et al ¹⁴⁸ sugirieron que una célula debería tener al menos 140 nm de grosor para contener en su interior el ADN, y las proteínas necesarias para función ¹⁴⁷. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que una célula sintética viable con un genoma capaz de codificar 387 proteínas y 43 genes ARN estructurales, *Mycoplasma laboratorium*, podría reducir su tamaño por debajo de esa limitación.

Las nanopartículas son muy resistentes al calor, y otros métodos que normalmente matarían a las bacterias, lo que hace que algunos científicos se pregunten si podría ser una forma inusual de cristal en lugar de organismos vivos ¹⁴⁰.

Varios trabajos recientes han presentado una teoría alternativa para los hallazgos iniciales de los estudios con nanopartículas. Afirmaron que la biomineralización previamente atribuida a las nanopartículas pudo ser iniciada por macromoléculas inertes, y trasladada a los subcultivos mediante la auto-propagación de microcristales de apatito. Refieren que el contenido proteico analizado fue muy escaso, y su composición resultó semejante a la fetuina A, albumina, y apolipoproteína A1 ^{133,137}. Otros grupos describieron que eran macromoléculas de carbonato cálcico ^{144,149,150}.

Los investigadores que son partidarios de que son una nueva clase de organismos vivos citan que se ha descrito su capacidad autorreplicativa ¹⁵¹, y, aunque no se ha detectado la presencia de DNA o RNA, se ha comprobado que incorporan uridina marcada radiactivamente. Además, eran capaces de activar la respuesta inmunitaria, y tenían capacidad citotóxica in vitro ^{94,132,152}.

También refieren que, algunas de las explicaciones que describen a las nanopartículas como cristalización no biológica, no pueden explicar alguna de las propiedades biológicas de las nanopartículas.

Algunos ejemplos de estas propiedades serían las siguientes:

- Cuando se añadían cristales de hidroxiapatito inorgánico al medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) se disuelve. Sin embargo, las nanopartículas que se añadían a medios idénticos podían autopropagarse ¹⁵³.
- Los cristales inorgánicos de apatito, en comparación con las nanopartículas, no estimulaban la respuesta inmunitaria, ni producían calcificación patológica ^{144,152}.
- Las nanopartículas tenían actividad citotóxica, y podían liberar endotoxina que podría cronificar la reacción inflamatoria local ¹⁴³.
- El crecimiento de las nanopartículas pudo ser inhibido mediante tetraciclina, dosis altas de aminoglucósidos, sal ácida etilenediaminotetraacético disódica (EDTA), arabinósido de citosina, 5 fluorouracilo, e irradiación Gamma ¹⁴².

2.4 Asociación de las nanopartículas con patologías humanas

La descripción de las nanopartículas promovió la idea que podrían ser patógenos infecciosos, y representar una amenaza a la salud. Dadas sus características se sugirió que estos agentes pueden estar involucrados en procesos patológicos donde la calcificación es una característica fundamental.

Se ha demostrado su presencia en un gran número de patologías:

- Placas de aterosclerosis calcificadas ^{154,155,156},
- válvulas aórticas calcificadas ^{136,152,157,158},
- calcificación del anillo mitral ¹⁵⁹
- cálculos renales ¹⁶⁰ y cálculos biliares ¹⁶¹,
- calcificaciones de los cuerpos de psamoma del cáncer de ovario ^{162,163},
- flora de la cavidad oral, y en la pulpa dental ¹³³,
- riñón poliquístico ¹⁶⁴, y
- prostatitis crónica ¹⁶⁵.

Se ha demostrado de forma experimental que la inoculación sanguínea de las nanopartículas en ratas inducía la formación de cálculos renales ^{166,167}, y la inoculación a conejos producía un aumento en la incidencia de cálculos biliares ¹⁶⁸.

El empleo de un tratamiento contra las nanobacterias, compuesto por una serie de vitaminas y aminoácidos, tetraciclina, y EDTA, que es un quelante del calcio, produjo una mejora en algunas patologías. Así, la administración de dicho tratamiento a pacientes con angina estable determinó una reducción en el score del calcio coronario, y una mejora en el grado funcional ¹⁵⁵. También se produjo una mejoría en los síntomas de pacientes con prostatitis crónica refractaria ¹⁶⁵.

3 Justificación del estudio

Resumiendo todo lo anteriormente expuesto, se sabe que la valvulopatía aórtica degenerativa constituye un importante problema de salud para la sociedad, y sobre todo para el grupo de pacientes mayores de 65 años, y que, en un futuro próximo, la prevalencia de esta enfermedad se incrementará por el mayor envejecimiento de la población.

La valvulopatía aórtica se trata de un proceso patológico activo, en el que la calcificación es la característica fundamental, y en el que participan un gran número de mecanismos patogénicos complejos, y no del todo conocidos.

Actualmente carecemos de un tratamiento médico eficaz de esta patología. Únicamente, la sustitución de la válvula aórtica por una prótesis reduce la mortalidad, en el paciente sintomático con estenosis aórtica severa con el riesgo correspondiente a someterse a una intervención.

Por tanto, es fundamental mejorar el conocimiento sobre la patogenia de la enfermedad, puesto que facilitaría el desarrollo de tratamientos encaminados a modificar la evolución de esta enfermedad.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

2.1.1. Hipótesis nula

No existen diferencias en el crecimiento de las nanopartículas en los cultivos de las válvulas aórticas entre los pacientes con estenosis aórtica degenerativa respecto a los que no presentan dicha valvulopatía.

2.1.2. Hipótesis alternativa

Existe un porcentaje mayor de crecimiento de las nanopartículas en los cultivos de las válvulas aórticas entre los pacientes con estenosis aórtica degenerativa, respecto a los pacientes que no presentan dicha valvulopatía, lo que nos llevaría a suponer que las nanopartículas podrían tener un posible papel en la etiopatogenia de la estenosis aórtica.

2.2. Objetivos

Esta Tesis se plantea los siguientes objetivos:

2.2.1. Objetivo Principal

Establecer la posible implicación de las nanopartículas en la etiopatogenia de la estenosis aórtica degenerativa mediante la identificación de las mismas en las válvulas obtenidas por cirugía.

2.2.2. Objetivos Secundarios

1. Investigar el posible origen biológico de las nanopartículas analizando los perfiles metabólicos de ^1H -RMN de medios de cultivo de las nanopartículas.
2. Analizar el perfil clínico de los pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa que van a ser intervenidos quirúrgicamente.
3. Comparar las características clínicas de los pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa respecto aquellos pacientes que no la presentan, de manera que, se pueda establecer otros posibles mecanismos de etiopatogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa.
4. Comparar las variables clínicas entre los grupos de pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa: estenosis aórtica severa pura, y estenosis aórtica severa asociada a insuficiencia; para comprobar si existen diferencias entre ambos grupos.
5. Comparar el perfil clínico de los pacientes con cultivos positivos con el perfil de los pacientes con cultivos negativos, y definir variables clínicas que se asocien con el crecimiento de las nanopartículas.

2.3. Interés científico

La confirmación de la implicación etiopatogénica de las nanopartículas en la estenosis aórtica degenerativa tendría una gran trascendencia desde el punto de vista médico con las hipotéticas siguientes consecuencias:

- 1 Ayudaría a conocer la etiología de un proceso que actualmente se ignora.
- 2 El mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos de la estenosis aórtica degenerativa conllevaría una mejora en el diagnóstico, en el seguimiento, así como en el tratamiento de esta enfermedad.
- 3 Finalmente, si se confirma que las nanopartículas son agentes microbiológicos, podría producirse un cambio radical en el tratamiento de la estenosis aórtica. De este modo tanto la vacunación, como el empleo de agentes antimicrobianos podrían tener un efecto protector en el desarrollo de esta enfermedad.

Capítulo 3

Material y métodos

3.1 Sujetos del estudio.

Se realizó un estudio casos-contrroles, para lo cual se incluyeron de forma consecutiva un total de 115 pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, entre enero de 2004 y febrero 2007, que cumplían los criterios de inclusión, y ninguno de los criterios de exclusión, que exponemos a continuación.

3.2. Criterios de inclusión

Pacientes con estenosis aórtica en los que estaba indicada la sustitución de la válvula enferma por una prótesis ⁴⁴ **(Tabla 5)**.

Tabla 5.- Indicaciones de sustitución valvular aórtica en estenosis aórtica según la Sociedad Europea de Cardiología

Pacientes con estenosis aórtica grave sintomática
Pacientes con estenosis aórtica grave a los que se va a realizar una intervención quirúrgica de pontaje aorto-coronario, en la aorta ascendente, o en otra válvula cardíaca
Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos que presentan disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (<50%) sin que exista otra causa
Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos que presenten síntomas durante la prueba de esfuerzo
Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos que presenten una respuesta tensional

alterada durante la prueba de esfuerzo.

Pacientes con estenosis aórtica moderada a los que se va a realizar una intervención quirúrgica de pontaje aorto-coronario, en la aorta ascendente, o en otra válvula cardíaca

Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos con calcificación moderada-grave, y una velocidad de progresión de la velocidad máxima aórtica ≥ 0.3 cm/s al año

Estenosis aórtica sintomática, con gradiente bajo (<40 mmHg) y disfunción sistólica de ventrículo izquierdo con reserva contráctil

Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos y con arritmias ventriculares complejas durante la prueba de esfuerzo

Pacientes con estenosis aórtica grave asintomáticos que presentan una hipertrofia ventricular grave (septo interventricular ≥ 15 mm) sin que exista otra causa

Estenosis aórtica con gradiente bajo (<40 mmHg) y disfunción sistólica de ventrículo izquierdo sin reserva contráctil

Pacientes con insuficiencia aórtica en los que estaba indicada la sustitución de la válvula enferma por una prótesis ⁴⁴ (**Tabla 6**).

Tabla 6.- Indicaciones de sustitución valvular aórtica en insuficiencia aórtica según la Sociedad Europea de Cardiología

Insuficiencia aórtica grave

Pacientes sintomáticos: angina, disnea, clase funcional II, III, IV de la NYHA

Pacientes asintomáticos con disfunción sistólica del ventrículo izquierdo en reposo ($\leq 50\%$) sin que exista otra causa

Pacientes a los que se va a realizar una intervención quirúrgica de pontaje aortocoronario, en la aorta ascendente o en otra válvula

Pacientes asintomáticos con una función sistólica de ventrículo izquierdo conservada en reposo ($>50\%$), con una dilatación del ventrículo izquierdo grave:

Diámetro telediastólico >70 mm, o

Diámetro telesistólico >50 mm (o >25 mm/m² SC)

Independencia de la gravedad de la insuficiencia aórtica

Pacientes con un diámetro de la raíz aórtica máximo

≥ 45 mm para pacientes con Síndrome de Marfan

≥ 50 mm para pacientes con válvula aórtica bicúspide

≥ 55 mm para el resto de pacientes

Pacientes en los que se encontraba indicado la realización de un trasplante cardíaco ¹⁶⁹ (**Tabla 7**).

Tabla 7.- Recomendaciones para el trasplante cardíaco

Indicaciones de trasplante cardíaco según la Sociedad Europea de Cardiología

Pacientes en el estadio final de insuficiencia cardíaca, con una sintomatología grave, un pronóstico pobre y que no presenten otras alternativas de tratamiento, ni una comorbilidad importante.

El paciente debe estar bien informado, motivado, emocionalmente estable, y ser capaz de cumplir con el tratamiento médico

Contraindicaciones de trasplante cardíaco según la Sociedad Europea de Cardiología

Consumo actual de alcohol y / o drogas; la falta de adecuada cooperación; enfermedad mental grave que no se contrala adecuadamente; pacientes con cáncer en remisión, con un seguimiento de 5 años; enfermedad sistémica con afectación multiorgánica; infección activa; insuficiencia renal significativa (aclaramiento de creatinina de 50 mL/min); elevada resistencia vascular pulmonar irreversible (6-8 unidades Wood y gradiente transpulmonar medio de 15 mmHg); complicaciones recientes tromboembólicas; úlcera péptica activa; evidencia de disfunción hepática significativa; otras comorbilidades graves que puedan marcar un mal pronóstico.

3.3. Criterios de exclusión

- Edad superior o igual a 85 años en el momento de la intervención quirúrgica.
- Rechazo por parte del paciente a participar en el estudio al no firmar del consentimiento informado.
- Pacientes que, por su condición clínica, esté indicado la realización de un trasplante cardíaco y presenten valvulopatía reumática como causa primaria o asociada del trasplante cardíaco.

3.4 Variables evaluadas.

Se detallan a continuación:

3.4.1. Variables demográficas.

- Sexo.
- Edad.
-

3.4.2. Factores de riesgo cardiovascular y otros antecedentes.

- Tabaquismo activo.
- Tabaquismo pasado.
- Hipertensión arterial.
- Dislipemia.
- Diabetes mellitus y tipo de tratamiento.
- Cardiopatía isquémica previa.
- Revascularización coronaria.
- Accidente cerebrovascular agudo.
- Claudicación intermitente.
- Historia familiar de cardiopatía isquémica.
- Historia de hepatopatía.
- Alcoholismo
- Enfermedad obstructiva pulmonar crónica.
- Hiperuricemia.

3.4.3. Variables de tratamiento médico

Se valoraron los siguientes grupos farmacológicos.

- Antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes.
- β Bloqueantes.
- Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina/ Inhibidores de los receptores de la angiotensina II.

- Calcioantagonistas.
- Estatinas.
- Corticoides-AINEs.
- Diuréticos.

3.4.4 Variables analíticas realizadas antes de la intervención quirúrgica

- Creatinina
- Sodio
- Potasio
- Fibrinógeno
- Calcio iónico
- Hemoglobina
- Hematocrito
- Leucocitos
- Plaquetas
- Colesterol total
- Colesterol LDL
- Colesterol HDL
- Triglicéridos

3.4.5 Variables ecocardiográficas

Todos los estudios se realizaron con dos equipos de ecocardiografía dotados de un transductor de 1,5 a 3 MHz (Vivid 3; General Electric; HDI 5000; ATL). El estudio se realizó con el paciente en decúbito lateral izquierdo según las indicaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía ¹⁷⁰. Se analizaron las siguientes variables:

- Fracción de eyección, expresada en porcentaje. se calculó mediante el método de Teichholz en modo M, o mediante el método de Simpson. Se consideró que la función del ventrículo izquierdo (FEVI) se encontraba alterada cuando la fracción de eyección es inferior a 55%, según las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía¹⁷⁰.
- Velocidad máxima aórtica mediante Doppler continuo medida en metros por segundo; m/sg.

- El gradiente transvalvular aórtico máximo y medio, medidos en milímetros de mercurio, mm Hg.
- Área valvular aórtica media en centímetros al cuadrado; cm²; o índice del area valvular aórtica medido en centímetro por metro al cuadrado; cm/m².
- Diámetro del tracto de salida del ventrículo izquierdo medido en milímetros; mm.

3.4.6 Variables angiográficas

Los estudios angiográficos se realizaron en dos salas de hemodinámica estándares (Siemens COROSKOP TOP).

En el estudio angiográfico se analizó la severidad de la lesiones angiográficas, así como su extensión y características. Se consideró una lesión significativa cuando la estenosis es superior al 50% de la luz de la arteria.

3.5 Definiciones.

Estenosis aórtica grave

Se utilizaron las recomendaciones para la evaluación ecocardiográfica de la estenosis valvular en la práctica clínica de la Sociedad Americana de Ecocardiografía ¹⁷¹ (Tabla 8).

Tabla 8.- Medidas de gravedad de la estenosis aórtica obtenidos por ecocardiografía Doppler según la American Society of Echocardiography

	Punto de corte	Unidad
Velocidad máxima del jet de la válvula aórtica	4.0	m/s
Gradiente medio de la válvula aórtica	40	mmHg
Área valvular aórtica	1.0	cm ²
Índice del área valvular aórtica	0.6	cm ² /m ²

Insuficiencia aórtica grave

Se utilizaron las recomendaciones para la evaluación ecocardiográfica de la gravedad de la regurgitación de la válvula nativa de la Sociedad Americana de ecocardiografía ¹⁷² (**Tabla 9**).

Tabla 9.- Medidas de gravedad de la insuficiencia aórtica obtenidos por ecocardiografía Doppler según la American Society of Echocardiography

	Punto de corte	Unidad
Tiempo de hemipresión del jet diastólico de regurgitación aórtico	<200	ms
Vena contracta	>0.6	cm
Área orificio de regurgitación	>0.3	cm ²
Relación anchura del jet diastólico con el tracto de salida del ventrículo izquierdo	≥65	%
Flujo reverso holodiastólico en la aorta descendente		

Tabaquismo

- Actual: fumador habitual en el último año.
- Exfumador: considerando aquel que ha abandonado el hábito de fumar hace más de un año.
- Nunca fumador.

Hipertensión arterial

La hipertensión arterial fue definida de acuerdo con los siguientes criterios:

- Historia de hipertensión diagnosticada o tratada con medicación, dieta y/o ejercicio,
- Cifras de presión arterial sistólica igual o superior a 140 mm Hg o diastólica igual o superior a 90 mm Hg en al menos dos determinaciones o,
- Uso de tratamiento antihipertensivo no atribuido a otra patología.

Dislipemia

- Historia de dislipemia diagnosticada y/o tratada por un médico,
- Cifras de colesterol total superiores a 200 mg/dl, o colesterol-LDL superior o igual a 130 mg/dl, o colesterol-HDL inferior a 40 mg/dl, o
- Utilización de tratamiento hipolipemiante.

Diabetes mellitus

- Historia de diabetes mellitus en cualquier informe médico o anotación médica,
- Documentación de glucemia en ayunas superior o igual a 200 mg/dl en cualquier situación, o al menos dos determinaciones de glucemia en ayunas superiores o iguales a 126 mg/dl, o
- Tratamiento actual con hipoglucemiantes orales y/o insulina.

Antecedentes de cardiopatía isquémica

- Infarto de miocardio. Episodio documentado de infarto de miocardio por historia clínica o presencia de onda Q patológica en el electrocardiograma previo al ingreso actual, o
- Angina previa. Episodio documentado de angina inestable o angina crónica estable constatado en la historia clínica.

Revascularización coronaria

- Intervención coronaria percutánea (ICP) previa; cualquier antecedente constatado de revascularización percutánea mediante angioplastia con o sin implantación de stent.
- Cirugía de revascularización coronaria; cualquier antecedente constatado de cirugía de revascularización coronaria mediante pontaje aortocoronario.

Accidente cerebral vascular

Historia de enfermedad cerebrovascular, documentada por cualquiera de los siguientes:

- Ictus isquémico o hemorrágico que produjo un déficit neurológico confirmado por un examen neurológico estándar con o sin estudio de imagen positivo, o un suceso de presunto origen isquémico que no se resolvió en 24 horas, pero en el que una prueba de imagen mostró una nueva lesión, o
- Historia de cualquier déficit neurológico focal brusco de origen presumiblemente isquémico determinado por un examen neurológico estándar que se resolvió completamente en 24 horas, con un estudio de imagen cerebral que no mostró una nueva lesión (accidente isquémico transitorio).

Enfermedad vascular periférica

Historia de enfermedad vascular periférica, con los siguientes antecedentes:

- Claudicación intermitente con el ejercicio o en reposo,
- Amputación por insuficiencia vascular arterial,
- Reconstrucción vascular, cirugía de derivación arterial o intervención percutánea en las extremidades, o
- Aneurisma aórtico documentado.

Historia familiar de cardiopatía isquémica

Antecedentes en cualquier familiar directo (padres, abuelos, hermanos o hijos) que haya presentado cualquiera de los eventos abajo indicados, en varones de edad inferior a 55 años o en mujeres de menos de 65 años:

- Angina.
- Infarto de miocardio.

Hepatopatía

- Historia de hepatitis vírica de cualquier tipo en cualquier informe médico o anotación médica,
- Documentación de niveles de transaminasas superior al doble del valor de referencia del laboratorio (generalmente 30-40 U/L)

Etilismo

- Consumo de alcohol superior o igual a 80 g/día.

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema previamente diagnosticados con constancia en informes médicos,
- Tratamiento concomitante crónico con terapia farmacológica inhalada y/u oral (agonista beta-adrenérgico, agente antiinflamatorio, antagonista del receptor de leucotrienos o esteroides), o
- Espirometría con patrón obstructivo en grado moderado o grave.

Hiperuricemia

- Historia de hiperuricemia diagnosticada y/o tratada por un médico,
- Cifras de ácido úrico total superiores a 7.0 mg/dl, , o
- Utilización de tratamiento hipouricemiente.

3.6 Cultivo de las válvulas aórticas.

Una vez la válvula es explantada en el quirófano de cirugía cardíaca, se llevó al laboratorio de microbiología donde se divide en dos partes:

1. Una parte se congeló a -80° con nitrógeno líquido, y se almacenó para futuros análisis.
2. La otra parte se destinó para el cultivo de las nanobacterias. Se utilizó el método descrito en la literatura por Kajander et al. ¹³² explicado a continuación.

2.1 El fragmento de la válvula se trituró en un mortero de vidrio estéril. Posteriormente se decalcificó mediante la adición de ácido clorhídrico 1 molar (HCl) 1 M), y se neutralizó la reacción mediante sosa 1 molar (NaOH 1M). La solución resultante se filtró a través de poros de 0,22µm de diámetro,

de manera que esta muestra se puede considerar estéril para los microorganismos convencionales. Finalmente se inoculó en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), al que se añadió suero fetal bovino irradiado, y se incubó durante 4-6 semanas a 37°C en una atmósfera con 5-10% de CO₂.

2.2 Una vez transcurridas entre 4 y 6 semanas se procedió a realizar una nueva resiembra. Se levantó la película de crecimiento en el frasco de Roux mediante perlas de vidrio, y, a continuación, se reinoculó en las mismas condiciones descritas previamente.

2.3 La conservación a largo plazo de las cepas obtenidas se realizó mediante liofilización. Se levantó el crecimiento en dos frascos de Roux mediante perlas de vidrio, y, a continuación, se concentraron las nanopartículas mediante centrifugación. El sedimento se suspendió en 1 mL de DMEM estéril que se congeló y, finalmente, se deshidrató mediante liofilización.

3.7 Análisis mediante microscopía electrónica de los cultivos de las nanopartículas.

El resultado del cultivo de varios frascos de Roux de la misma válvula se recogió para la observación mediante microscopio electrónico (Microscopio JEOL JEM-1200 EXII). Para levantar el cultivo se empleó una goma de raspado en cada frasco, a continuación se lavó la goma con agua destilada para arrastrar los depósitos, se combinaron los diferentes sedimentos, y, finalmente se centrifugó para su concentración.

Para la observación mediante microscopía electrónica de transmisión, se fijó el sedimento con glutaraldehído al 2,5%, se realizó el tratamiento postfijación con tetróxido de osmio, se deshidrató con acetona y se incluyó en un bloque de resina. A continuación se tallaron los bloques, se cortaron en láminas con un grosor de 300 Å, y se colocaron en una rejilla de cobre para su visualización. Para la observación con microscopía electrónica de barrido, se fijó el sedimento de las nanopartículas con glutaraldehído al 2,5%, se deshidrató con acetona y se contrastó con oro. Con el

mismo método que acabamos de describir se realiza un microanálisis de fluorescencia con rayos X.

3.8 Análisis metabolómico de los cultivos de las nanopartículas

Para el análisis posterior de espectroscopia por resonancia magnética (RM) se seleccionaron de forma aleatoria seis válvulas aórticas con cultivo positivo del conjunto del grupo. Este análisis fue realizado en el laboratorio experimental del Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona durante la etapa en la que el doctando estuvo contratado con una beca Río Hortega en el Servicio de Cardiología de dicho hospital.

Una vez establecido el cultivo, se realizaron pases posteriores en DMEM sin contenido de suero de ternera fetal. Todos los medios de cultivo utilizados tenían una antigüedad de al menos cinco pases. Después de una incubación de 6-8 semanas en cultivo, se utilizó medio recién preparado para la espectroscopia por RM, y se congeló en condiciones estériles para un posterior análisis mediante reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Las válvulas no calcificadas no dieron lugar a crecimiento de nanopartículas. Como control, utilizamos medios estériles mantenidos en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo que los cultivos de nanopartículas calcificantes.

3.8.1. Espectroscopia

Los medios de los cultivos de nanopartículas se obtuvieron en condiciones estériles y se diluyeron en proporción 1:1 en óxido de deuterio (D₂O) antes de la espectroscopia por RM.

Se obtuvo el espectro de RM del cultivo en un imán vertical a 400 MHz equipado con una sonda de 5 mm conectada a un espectrómetro Bruker Avance (Bruker; Madrid, España). Se utilizaron secuencias de pulso y adquisición unidimensionales, precedidas de una secuencia 3-9-19 WATERGATE para reducir la señal del agua; cada espectro se formó por la acumulación de 64 exámenes y tuvo una

duración de aproximadamente 6 min. En algunas muestras se obtuvieron espectros bidimensionales de espectroscopia de correlación ^1H - ^1H y de coherencia de cuanto único heteronuclear ^1H - ^{13}C para fines de asignación de los picos. Todos los espectros se obtuvieron a 30 °C.

3.8.2. Identificación de patrones

Para la identificación de patrones, se digitalizaron los espectros de RM unidimensional en 1.000 elementos, se eliminó el área que contenía los picos de agua residuales de entre 4,25 y 5,25 ppm, y se introdujeron los espectros resultantes en el programa informático SIMCA-P (Umetrics; Umea°, Suecia) según lo descrito con anterioridad ¹⁷³. Se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) de la base de datos de los espectros, que permitió una reducción del número de variables (picos de RM o metabolitos en nuestro caso) en vectores ortogonales, y por tanto independientes, según las fuentes de variación n , de tal manera que cada vector correspondiera a una fuente de variación en orden descendente. Dado que el ACP es un método no supervisado, no comporta introducción de datos por el observador, y las muestras se agrupan únicamente en función de las fuentes de variación existentes en el conjunto de datos; este es el enfoque carente de sesgo que preferimos para detectar cualquier posible cambio de los espectros relacionado con actividad metabólica.

3.9 Análisis material genético de los cultivos de las nanopartículas

Con objeto de determinar la presencia de bacterias en las nanopartículas, se descongeló el medio y se sometió, en condiciones estériles, a una RT-PCR de la región hipervariable V4 del gen del 16SrRNA bacteriano. Las regiones V4 (290 pb) se amplificaron usando cebadores universales situados en secuencias de la región V4 con una alta conservación: V4 F (5'-GCC AGC AGC CGC GGT AA-3') y V4R_805_19 (5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA T-3'). Elegimos estos cebadores de entre diversos pares comúnmente mencionados en la literatura, porque se correspondían con la

mayoría de las secuencias bacterianas depositadas en el Ribosomal Database Project¹⁷⁴. Se analizó la válvula cultivada y el medio DMEM descongelado antiguo (control negativo) utilizando un método de diseño ciego. Para generar una curva estándar, se utilizaron las cantidades calculadas de un plásmido linealizado, en el que se había introducido la región V4 de una bacteria de control. Se determinó la concentración del plásmido con el empleo de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nucliber), y se calculó el número de copias del plásmido a partir del peso molecular de este.

Se amplificaron diluciones seriadas del plásmido de entre 10^2 y 10^7 para poder extrapolar el número de bacterias de cada muestra. Además, se determinaron los controles positivos y negativos en paralelo en cada tanda de análisis. Se llevó a cabo una amplificación y detección del ADN mediante RT-PCR con el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, California, Estados Unidos) utilizando placas de 96 pocillos de grado óptico. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l utilizando un Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) con un contenido de 100 nM de cada uno de los cebadores directos e inversos universales. Las condiciones de reacción para la amplificación fueron de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se calcularon los valores medios. Se obtuvieron curvas de fusión, que se examinaron tras una amplificación para determinar la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa.

3.10 Análisis estadístico.

3.10.1. Estimación del tamaño muestral

A pesar de que el estudio se realizó de una forma prospectiva, no fue posible realizar la estimación del cálculo del tamaño muestral al inicio del trabajo. La explicación es sencilla. El diseño del trabajo fue novedoso y original. Esto es, no había ningún dato previo en la literatura sobre la prevalencia del crecimiento de las nanopartículas en las válvulas aórticas. De manera que, al no tener una prevalencia estimada de la variable considerada, no se pudo realizar dicho cálculo, ya que es uno de los factores necesarios para determinar el tamaño muestral adecuado.

3.10.2. Variables cualitativas y cuantitativas

Las variables discretas se presentan en forma de valores absolutos (número de casos) y en frecuencias teóricas (porcentajes). Las variables continuas se presentan en forma de media y desviación estándar si cumplían condiciones de normalidad, o de mediana y rango (percentiles 25 y 75) si no las cumplían. Se verificó la distribución normal de las variables cuantitativas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Además de realizar un análisis descriptivo de cada una de las variables, se llevó a cabo un análisis estadístico bivariado entre las distintas variables analizadas. Las variables cualitativas se compararon con las pruebas de la chi-cuadrado y exacta de Fisher, si las frecuencias esperadas eran inferiores a 5. Las variables cuantitativas se compararon con la prueba de la T de Student o su equivalente en pruebas no paramétricas, la U de Mann Whitney para las variables que no tenían una distribución normal.

3.10.3. Análisis multivariante

Las variables predictivas que en el estudio univariante presentaron una $p < 0.05$ se incluyeron en el análisis multivariante. Se realizó mediante el análisis de regresión logística binaria con el criterio de paso a paso hacia atrás. No se utilizaron más de una variable por cada 10 eventos para evitar saturación. En el modelo final se calculó la odds ratios (OR) ajustada de todas las variables incluidas, y los intervalos de confianza se estimaron del 95%. Para evaluar la bondad de ajuste del modelo se realizó la prueba de Homer-Lemeshow.

El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado mediante el programa PASW (versión 17.0.2, Chicago, Illinois, Estados Unidos) para Windows. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias en las que había un valor de p nominal bilateral sin ajustar < 0.05 .

Capítulo 4

Resultados

A continuación se presentan los resultados de esta tesis doctoral siguiendo el orden que se detalla:

1. Población del estudio.
2. Resultados globales descriptivos.
3. Cultivo válvula aórtica.
4. Análisis diferencial entre los distintos grupos.
5. Factores predictores de valvulopatía aórtica degenerativa.
6. Factores predictores de crecimiento de nanopartículas en las válvulas aórticas degenerativas.
7. Análisis metabolómico del medio de cultivo de válvulas con crecimiento vs medio DMEM.
8. Análisis genético del medio de cultivo de válvulas con crecimiento de nanopartículas.

4.1. Población del estudio

Se incluyeron en el trabajo 115 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. A continuación los pacientes se dividieron en 4 grupos de estudio, según la patología de base: grupo 1, estenosis aórtica severa aislada; grupo 2, doble lesión aórtica, con estenosis severa; grupo 3, insuficiencia aórtica severa aislada; y grupo 4, trasplante cardiaco (**Figura 3**).

En todos los pacientes se recogieron los datos basales planificados al inicio del estudio.

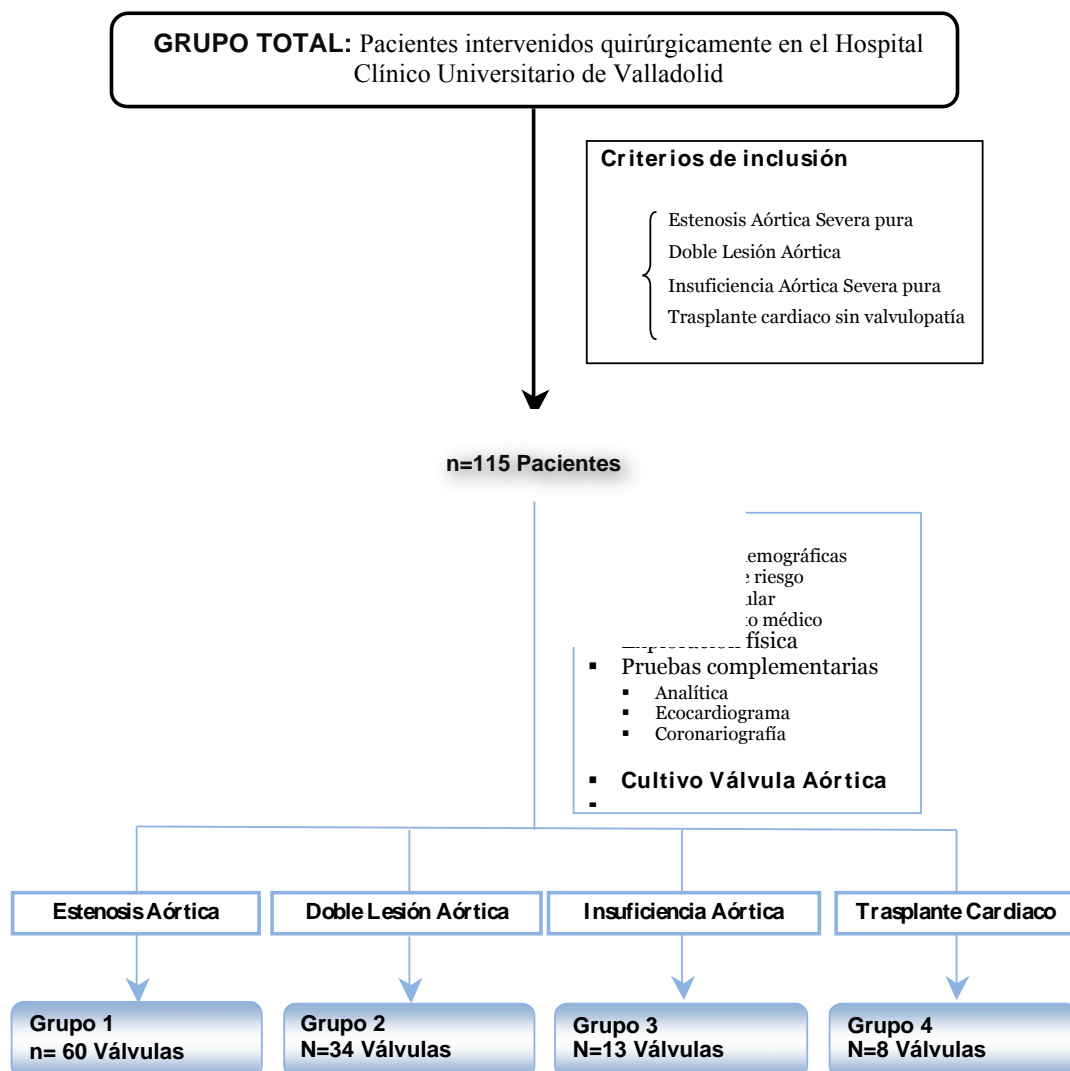


Figura 3.- Grupo de pacientes .

4.2 Resultados globales descriptivos

4.2.1. Variables demográficas y clínicas

Las características demográficas de los pacientes, sus factores de riesgo cardiovascular, así como los antecedentes patológicos más frecuentes se describen en la **Tabla 10**. La edad media en el grupo global fue de 70 años. Se trataba en su mayoría de pacientes varones (65%). El antecedente personal más frecuente fue la hipertensión arterial (57%), seguido de la dislipemia (42%). La prevalencia de diabetes mellitus fue de un 24%, mientras que los pacientes con antecedentes de tabaquismo actual o en el pasado constituían solamente un 10%.

De forma similar se describen los datos demográficos en los diferentes grupos. La edad media en los grupos 1 y 2 fue mayor (72 y 71 años, respectivamente), respecto a los grupos 3 y 4 (61 y 62 años respectivamente). El factor de riesgo cardiovascular más frecuente en los tres primeros grupos fue la hipertensión arterial (60% en el grupo 1, 53% en el grupo 2, y 62% en el grupo 3), mientras que el tabaquismo, la hipertensión arterial, y la dislipemia fueron los más frecuentes en el grupo 4. La mitad de los pacientes del grupo 1 y 4 tenían dislipemia. Cabe destacar que el antecedente de cardiopatía isquémica fue frecuente (50%) en el grupo 4. El resto de factores de riesgo cardiovascular, y antecedentes patológicos en los diferentes grupos fue relativamente bajo.

Tabla 10. Parámetros demográficos y clínicos en el conjunto de la muestra

Variable	Grupo total (n=115)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)
Variables demográficas					
Sexo varón	75 (65%)	35 (58%)	20 (59%)	12 (92%)	8 (100%)
Edad, años	70±9	72±7	71±9	61±13	62±5
Exploración física					
Presión arterial sistólica, mmHg	130±16	128±17	133±15	132±18	107±14
Presión arterial diastólica, mmHg	65±11	65±12	65±9	66±13	64±5
Factores de riesgo cardiovascular					
Antecedentes de tabaquismo	11 (10%)	2 (3%)	1 (3%)	4 (31%)	4 (50%)
Hipertensión arterial	66 (57%)	36 (60%)	18 (53%)	8 (62%)	4 (50%)
Dislipemia	48 (42%)	30 (50%)	12 (35%)	2 (15%)	4 (50%)
Diabetes mellitus	28 (24%)	16 (27%)	7 (21%)	2 (15%)	3 (37.5)
Tratamiento dieta	4 (14%)	2 (13%)	1 (14%)	1 (50%)	0 (0%)
Antidiabeticos orales	15 (54%)	8 (50%)	4 (57%)	1 (50%)	2 (67%)
Tratamiento con insulina	9 (32%)	6 (38%)	2 (29%)	0 (0%)	1 (33%)

Comorbilidad

Antecedentes de CI	22 (19%)	13 (22%)	4 (12%)	1 (8%)	4 (50%)
Revascularización coronaria	13 (11%)	9 (15%)	2 (6%)	1 (8%)	4 (50%)
Antecedentes familiares de CI	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Enfermedad vascular periférica	13 (11%)	6 (10%)	6 (18%)	0 (0%)	1 (13%)
Accidente cerebrovascular agudo	9 (8,5%)	4 (7%)	3 (9%)	2 (15%)	0 (0%)
Hepatopatía	5 (4%)	3 (5%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (13%)
Enolismo	5 (4%)	3 (5%)	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
EPOC	9 (8%)	8 (13%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
Hiperuricemia	9 (8%)	7 (12%)	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

CI: Cardiopatía isquémica.

4.2.2. Variables de tratamiento médico

En la **Tabla 11** se recoge el porcentaje de pacientes que en el momento de la intervención quirúrgica recibía algún tratamiento farmacológico, tanto en el grupo global, como en cada uno de los grupos diferentes de pacientes. Destacó en el grupo global el empleo de diuréticos en un 43% de pacientes, y que, aproximadamente, un tercio de pacientes se encontraba en tratamiento con estatinas (37%), y con antiagregantes (35%). En el grupo 1 el fármaco más utilizado fueron los antiagregantes (45%). Tanto en el grupo 1, como en el grupo 2, los grupos farmacológicos más frecuentes fueron las estatinas (42% y 35%, respectivamente) y los diuréticos (33% y 47%, respetivamente); en el grupo 3 fueron los diuréticos (62%), los anticoagulantes (54%), y los IECAs (39%); mientras que en el grupo 4 los fármacos más empleados fueron los β bloqueantes (63%) y diuréticos (63%), los IECAs (50%), y las estatinas (50%).

Tabla 11. Datos del tratamiento de los pacientes en el momento de ingreso

Variable	Grupo total (n=115)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)
Tratamiento médico					
Antiagregante	40 (35%)	27 (45%)	9 (27%)	1 (8%)	3 (38%)
Anticoagulante	29 (25%)	10 (17%)	11 (32%)	7 (54%)	1 (13%)
B Bloqueante	36 (31%)	17 (28%)	10 (29%)	4 (31%)	5 (63%)
Ca Antagonista	17 (15%)	12 (20%)	2 (6%)	2 (15%)	1 (13%)
IECA	25 (22%)	9 (15%)	7 (21%)	5 (39%)	4 (50%)
Estatinas	42 (37%)	25 (42%)	12 (35%)	1 (8%)	4 (50%)
AINES	6 (5%)	2 (3%)	4 (12%)	0 (0%)	0 (0%)
Corticoides	2 (2%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Diuréticos	49 (43%)	20 (33%)	16 (47%)	8 (62%)	5 (63%)
ARA II	10 (9%)	5 (13%)	4 (12%)	1 (8%)	0 (0%)

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

ARA II: Antagonista de los receptores de la angiotensina II.

4.2.3. Variables analíticas

Los datos analíticos en el momento de ingreso se reflejan en la **Tabla 12**, con cifras normales de creatinina, perfil lipídico, y calcio, tanto en el grupo global, así como en cada uno de los diferentes grupos de pacientes. La mediana de leucocitos en sangre fue normal en el grupo global (6440/mm³) y en los tres primeros grupos (6290/mm³, 6530/mm³, 6610/mm³; respectivamente). En cambio, la mediana de leucocitos en el grupo 4 se encontraba en el límite superior del valor normal (9850/mm³). Los valores de fibrinógeno se encontraron dentro de los límites normales en todos los grupos.

Tabla 12. Valores analíticos en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso

Variable	Grupo total (n=115)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)
Datos analíticos					
Creatinina plasmática, mg/dl	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.8-1.13)	1.0 (0.83-1.33)	1.0 (0.83-1.26)
Colesterol total, mg/dl	182±38	188±40	179±37	172±30	152±37
Colesterol HDL, mg/dl	51±13	51±11	53±18	42±10	56±4
Colesterol LDL, mg/dl	104±29	103±28	108±33	98±29	103±11
Triglicéridos, mg/dl	113±57	126±66	101±40	96±39	68±4
Calcio, mg/dl	9.7 (9.2-9.9)	9.7 (9.2-9.9)	9.8 (9.4-9.9)	9.7 (9.1-10)	8.8 (8.2-9.8)
Número de leucocitos, /mm ³	6440 (5360-7585)	6290 (5340-7310)	6530 (5748-7555)	6610 (4673-7800)	9850 (6365-15975)
Fibrinógeno, mg/dl	298±121	302±110	277±99	324±166	321±203

4.2.4. Variables ecocardiográficas y angiográficas

La mediana de la fracción de eyección de la muestra fue del 60 %. La media del gradiente aórtico máximo fue de 75 mmHg, y la mediana del área valvular en el grupo global fue de 0,8 cm². Encontramos valores similares de fracción eyección y gradiente aórtico máximo tanto en el grupo 1 (60% y 77 mmHg), como en el grupo 2 (60% y 77 mmHg). En cambio, la mediana de la fracción de eyección en el grupo 3 resultó ligeramente inferior (51 %), y se encontró francamente reducida en el grupo 4 (28%). El gradiente aórtico máximo resultó normal en el grupo 3 (33 mmHg) (**Tabla 13**).

Se realizó una coronariografía preoperatoria a todos los pacientes. El 42% de los pacientes presentaron lesiones significativas/graves en dicho estudio. En los grupos 4 (75%) y 1 (47%) se encontraron porcentajes superiores de lesiones coronarias significativas/graves. Se realizó una ventriculografía para cuantificar la fracción de

eyección del ventrículo izquierdo en 44 pacientes (38%). La fracción de eyección cuantificada por ventriculografía mostró resultados similares a los obtenidos mediante ecocardiografía (**Tabla 13**).

Tabla 13. Variables ecocardiográficas y angiográficas en el conjunto de la muestra

Variable	Grupo total (n=115)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)
Variables ecocardiográficas					
FEVI, %	60 (52-63)	60 (57-64)	60 (57-62)	51 (41-62)	28 (24-30)
Gradiente máximo, mmHg	75±15	77±20	77±22	33±16	—
Gradiente medio, mmHg	46±15	48±12	44±18	24±10	—
Área valvular aórtica, cm ²	0.8 (0.6-0.9)	0.78 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)		
Variables coronariografía					
Lesión coronaria significativa	48 (42%)	27 (47%)	12 (35%)	3 (23%)	6 (75%)
FEVI, %	53±12	56±9	58±9	45±14	29±2

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

4.3. Cultivo de las válvulas aórticas

4.3.1 Resultado positivo del cultivo

El cultivo se consideró positivo cuando, después de 6-8 semanas de incubación, aparecía un pequeño precipitado blanquecino que se encontraba firmemente adherido a la parte inferior de los frascos de los cultivos, y presentaba una granulación fina en su superficie (**Figura 4**).

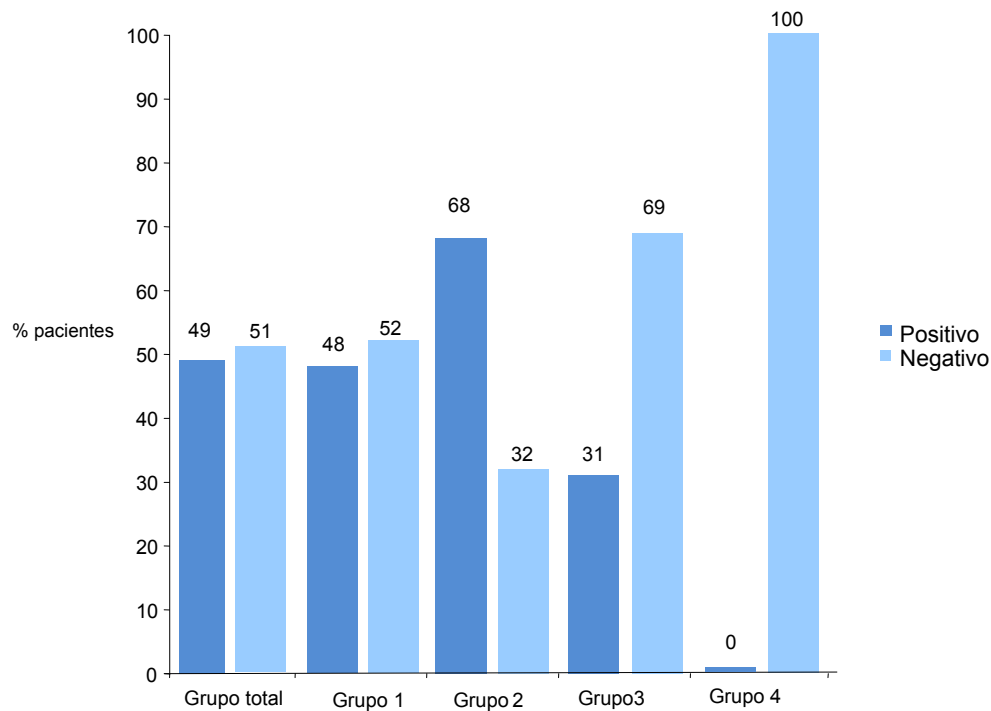


Figura 4: El frasco de cultivo positivo (B) muestra una película blanquecina firmemente adherida a la pared del frasco, y su ausencia en los frascos de cultivo negativo (A).

El cultivo fue positivo en 56 pacientes (49%) del grupo global. Por grupos, el cultivo fue positivo en 29 pacientes (48%) del grupo de la estenosis aórtica grave pura; en 23 pacientes (68%) del grupo de pacientes con doble lesión aórtica; en 4 pacientes (31%) del grupo de pacientes con insuficiencia aórtica grave pura; y en 0 pacientes (0%) del grupo de trasplante cardíaco (**Tabla 14**).

Tabla 14. Resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el conjunto de la muestra

Variable	Grupo total (n=115)	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)
Cultivo de las válvulas aórticas					
Cultivo positivo, %	56 (49%)	29 (48%)	23 (68%)	4 (31%)	0 (0%)



4.3.2. Análisis mediante microscopía electrónica del cultivo de las nanopartículas

4.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido

La visualización del precipitado blanquecino de los cultivos positivos mediante microscopía electrónica de barrido nos mostró unas partículas esferoidales, de un tamaño aproximado entre 0.2-0.5 μm , rodeadas de una capsula granulosa y agrupadas entre sí, formando pequeños racimos (**Figura 5**).

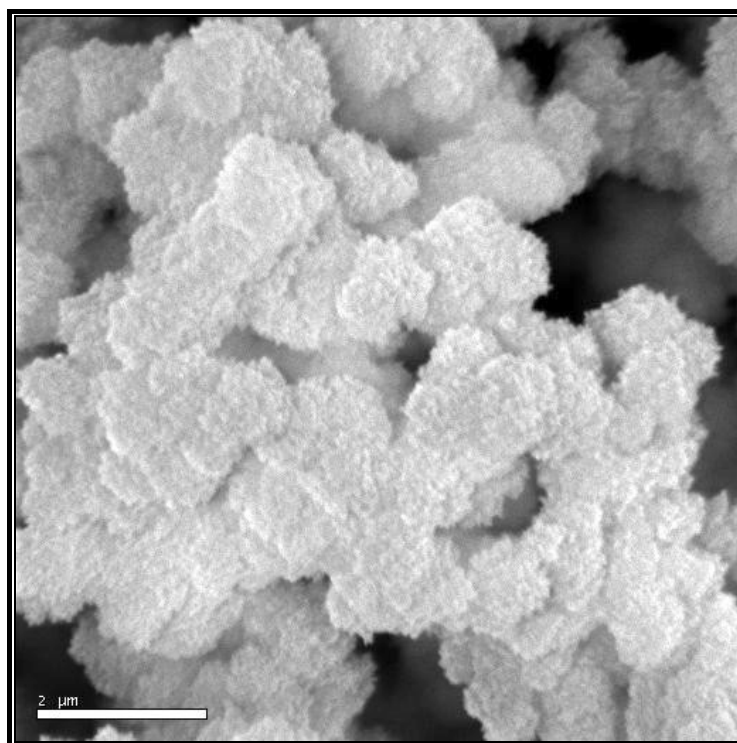


Figura 5: El microscopio de barrido identificó unas partículas esféricas calcificadas de un tamaño aproximado de 0.2 μm , rodeadas de una capsula granulosa y agrupadas entre si.

4.3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Al observar los cultivos positivos mediante microscopía electrónica de transmisión nos encontramos con unas partículas pleomórficas, donde pudimos identificar la cápsula granulosa previamente descrita en el apartado anterior. En el interior de la capsula visualizamos otra estructura ovoide, rodeada de una especie de membrana, que muchos autores han descrito como un citoplasma con su membrana ¹³² (**Figura 6**).

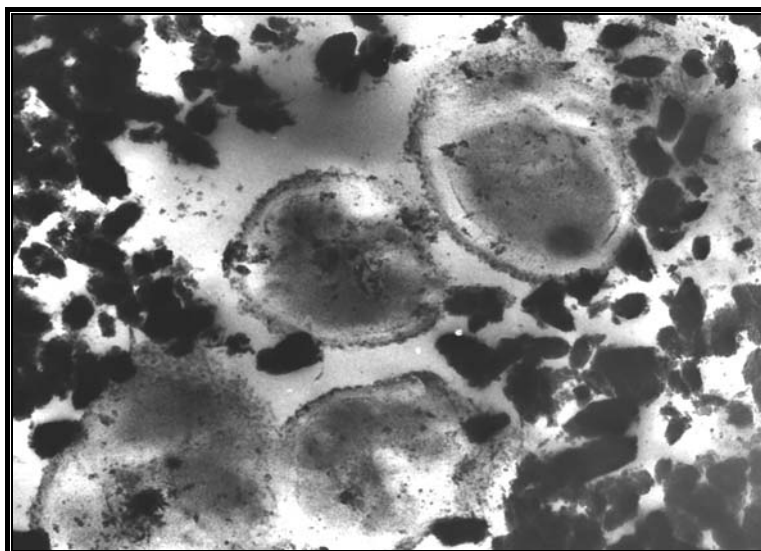


Figura 6: El microscopio electrónico de transmisión muestra unas partículas pleomórficas, con un tamaño medio de 0.2-0.5 μm , y rodeadas de una capsula.

4.3.2.3. Análisis por fluorescencia de rayos X

El análisis de dichas nanopartículas mediante fluorescencia de rayos X nos indicó que el calcio y el fósforo eran los principales componentes de su capsula. Es importante destacar que ambos elementos químicos son los componentes principales que forman los cristales de hidroxiapatito cálcico ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que es el principal depósito de calcio y fósforo en el cuerpo humano (**Figura 7**).

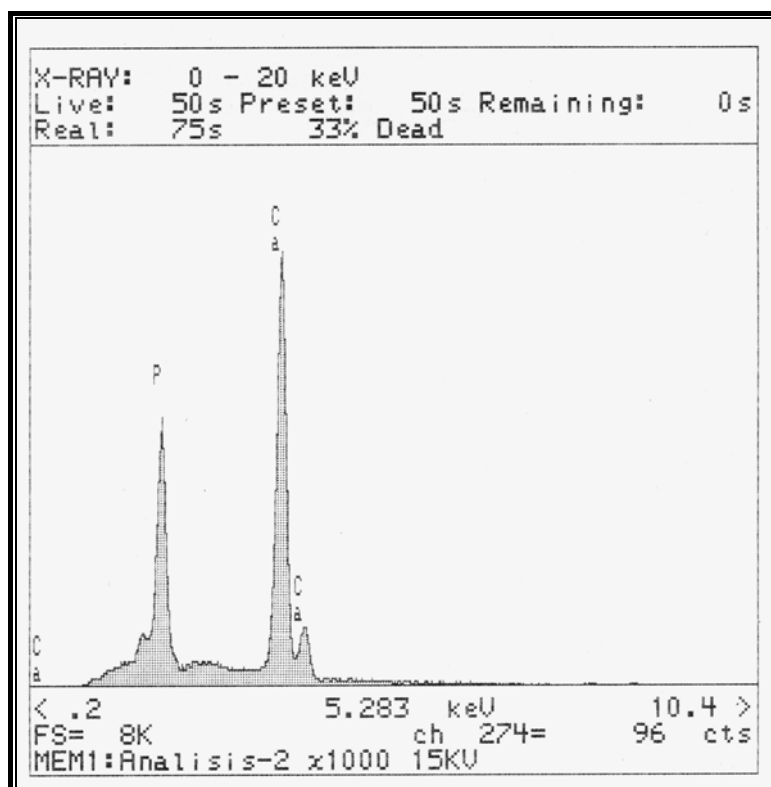


Figura 7: El análisis de fluorescencia de rayos X de las nanopartículas mostró unos picos de calcio y fósforo, que son los principales componentes básicos del hidroxiapatito cálcico.

4.4. Análisis diferencial entre los distintos grupos

4.4.1. Análisis univariado

En las **Tablas 15 a 18** se muestran los resultados del análisis univariado en el conjunto de la muestra.

Cuando se compararon los diferentes grupos entre sí, dentro de las variables demográficas y clínicas observamos que había diferencias en relación con la edad de los pacientes ($p<0.001$), el sexo masculino ($p=0.016$), el antecedente de tabaquismo ($p<0.001$) y el antecedente de revascularización coronaria ($p=0.012$) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Comparación de los parámetros demográficos y clínicos en el conjunto de la muestra

Variable	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)	p
Variables demográficas					
Sexo					
Varón	35 (58%)	20 (59%)	12 (92%)	8 (100%)	0.016
Edad, años	72±7	71±9	61±13	62±5	<0.001
Exploración física					
Presión arterial sistólica, mmHg	128±17	133±15	132±18	107±14	0.551
Presión arterial diastólica, mmHg	65±12	65±9	66±13	64±5	0.961
Factores de riesgo cardiovascular					
Antecedentes de tabaquismo	2 (3%)	1 (3%)	4 (31%)	4 (50%)	<0.001
Hipertensión arterial	36 (60%)	18 (53%)	8 (62%)	4 (50%)	0.870
Dislipemia	30 (50%)	12 (35%)	2 (15%)	4 (50%)	0.102
Diabetes mellitus	16 (27%)	7 (21%)	2 (15%)	3 (38%)	0.625
Comorbilidad					
Antecedentes de CI	13 (22%)	4 (12%)	1 (8%)	4 (50%)	0.058
Revascularización coronaria	9 (15%)	2 (6%)	1 (8%)	4 (50%)	0.012
Antecedentes familiares de CI	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.816
Enfermedad vascular periférica	6 (10%)	6 (18%)	0 (0%)	1 (13%)	0.371
Accidente cerebrovascular agudo	4 (7%)	3 (9%)	2 (15%)	0 (0%)	0.600
Hepatopatía	3 (5%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (13%)	0.554
Enolismo	3 (5%)	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.751
EPOC	8 (13%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0.143
Hiperuricemia	7 (12%)	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.364

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

CI: Cardiopatía isquémica.

Respecto al tratamiento farmacológico en el momento del ingreso observamos que hay diferencias entre los grupos de pacientes respecto al tratamiento con antiagregantes ($p=0.045$) y con anticoagulantes ($p=0.022$) (**Tabla 16**).

Tabla 16. Comparación del empleo de fármacos en el conjunto de la muestra en el momento de ingreso

Variable	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)	p
Tratamiento médico					
Antiagregante	27 (45%)	9 (27%)	1 (8%)	3 (38%)	0.045
Anticoagulante	10 (17%)	11 (32%)	7 (54%)	1 (13%)	0.022
B Bloqueante	17 (28%)	10 (29%)	4 (31%)	5 (63%)	0.270
Ca Antagonista	12 (20%)	2 (6%)	2 (15%)	1 (13%)	0.324
IECA	9 (15%)	7 (21%)	5 (39%)	4 (50%)	0.057
Estatinas	25 (42%)	12 (35%)	1 (8%)	4 (50%)	0.112
AINES	2 (3%)	4 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	0.209
Corticoides	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.601
Diuréticos	20 (33%)	16 (47%)	8 (62%)	5 (63%)	0.134
ARA II	5 (13%)	4 (12%)	1 (8%)	0 (0%)	0.755

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

ARA II: Antagonista de los receptores de la angiotensina II.

Dentro de los parámetros analíticos no encontramos diferencias entre los distintos grupos. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo, tanto medida con método ecocardiográfico ($p < 0.001$), como medida mediante ventriculografía ($p < 0.001$), fue diferente en los distintos grupos. También encontramos diferencias en los valores del gradiente aórtico máximo ($p = 0.003$) (**Tabla 17**).

Tabla 17. Comparación de las pruebas complementarias en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso

Variable	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)	p
Datos analíticos					
Creatinina plasmática, mg/dl	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.8-1.13)	1.0 (0.83-1.33)	1.0 (0.83-1.26)	0.605
Colesterol total, mg/dl	188±40	179±37	172±30	152±37	0.223
Colesterol HDL, mg/dl	51±11	53±18	42±10	56±4	0.467
Colesterol LDL, mg/dl	103±28	108±33	98±29	103±11	0.921
Triglicéridos, mg/dl	126±66	101±40	96±39	68±4	0.062
Calcio, mg/dl	9.7 (9.2-9.9)	9.8 (9.4-9.9)	9.7 (9.1-10)	8.8 (8.2-9.8)	0.539
Número de leucocitos, /mm ³	6290 (5340-7310)	6530 (5748-7555)	6610 (4673-7800)	9850 (6365-15975)	0.063
Fibrinógeno, mg/dl	302±110	277±99	324±166	321±203	0.629
Variables ecocardiográficas					
FEVI, %	60 (57-64)	60 (57-62)	51 (41-62)	28 (24-30)	<0.001
Gradiente máximo, mmHg	77±20	77±22	33±16	—	0.003
Gradiente medio, mmHg	48±12	44±18	24±10	—	0.088
Variables coronariografía					
Lesión coronaria significativa	27 (47%)	12 (35%)	3 (23%)	6 (75%)	0.103
FEVI, %	56±9	58±9	45±14	29±2	<0.001

PCR: Proteína C Reactiva.

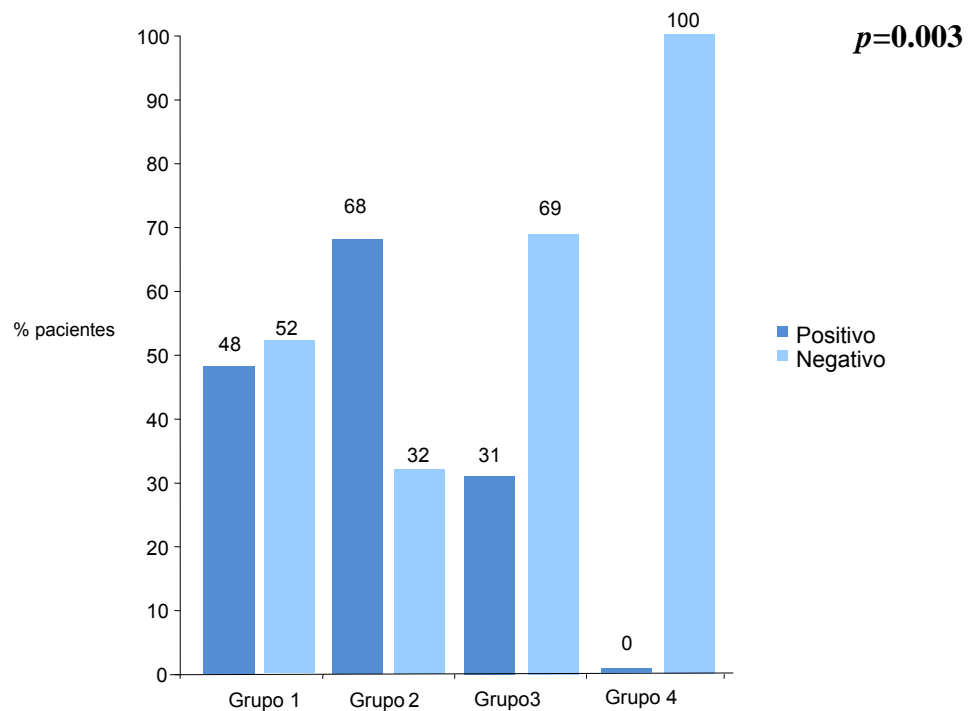
Pro BNP: Péptido natriurético tipo B

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

Al analizar el crecimiento de las nanopartículas en las válvulas aórticas observamos que hay diferencias entre los distintos grupos, con una mayor frecuencia de cultivos positivos en los grupos de estenosis aórtica (grupos 1 y 2) respecto a los grupos sin estenosis (grupos 3 y 4) (**Tabla 18**).

Tabla 18. Comparación del resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el conjunto de la muestra

Variable	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=34)	Grupo 3 (n=13)	Grupo 4 (n=8)	p
Cultivo de las válvulas aórticas					
Cultivo positivo, %	29 (48%)	23 (68%)	4 (31%)	0 (0%)	0.003



4.5. Factores predictores de valvulopatía aórtica degenerativa

Para intentar determinar qué variables se asociaron con la estenosis aórtica en nuestra población de estudio dividimos el total de la muestra en dos grupos: pacientes con estenosis aórtica severa en el que hemos incluido a los pacientes del grupo 1 y 2; y grupo control, en el que hemos incluido a los pacientes del grupo 3 y 4.

4.5.1. Análisis univariado estenosis aórtica

En las **Tablas 19 a 22** se muestran los resultados del análisis univariado del grupo de pacientes con estenosis aórtica degenerativa severa.

Cuando se compararon las variables demográficas y clínicas entre los dos grupos, observamos que los pacientes con estenosis aórtica eran mayores (71 ± 7.5 vs 61 ± 11 ; $p=0.001$), hubo menor proporción de hombres (59% vs 95%; $p=0.001$), y eran menos fumadores (3% vs 38%; $p<0.001$) (**Tabla 19**).

Tabla 19. Comparación de los parámetros demográficos y clínicos del grupo de pacientes con valvulopatía aórtica unta de la muestra

Valvulopatía aortica degenerativa			
Variable	Si (n=94)	No (n=21)	p
Variables demográficas			
Sexo			
Varón	55 (59%)	20 (95%)	0.001
Edad, años	71±8	61±11	0.001
Factores de riesgo cardiovascular			
Antecedentes de tabaquismo	3 (3%)	8 (38%)	<0.001
Hipertensión arterial	54 (57%)	12 (57%)	0.980
Dislipemia	42 (45%)	6 (29%)	0.176
Diabetes mellitus	23 (25%)	5 (24%)	0.949
Comorbilidad			
Antecedentes de CI	17 (18%)	5 (24%)	0.767
Revascularización coronaria	11 (12%)	5 (24%)	0.137
Antecedentes familiares de CI	1 (1%)	0 (0%)	0.816
Enfermedad vascular periférica	12 (13%)	1 (5%)	0.267
Accidente cerebrovascular agudo	7 (7%)	2 (10%)	0.516
Hepatopatía	4 (4%)	1 (5%)	0.646
Enolismo	5 (5%)	0 (0%)	0.358

EPOC	9 (10%)	0 (0%)	0.151
Hiperuricemia	9 (10%)	0 (0%)	0.151

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
CI: Cardiopatía isquémica.

En relación con el tratamiento farmacológico en el momento del ingreso observamos que los pacientes con estenosis aórtica eran tratados con menor frecuencia con IECAs (17% vs 43%; 0.021), y diuréticos (38% vs 62%; p=0.048) (**Tabla 20**).

Tabla 20. Comparación del empleo de fármacos en el conjunto de la muestra en el momento de ingreso

Estenosis aórtica			
Variable	Si (n=94)	No (n=21)	p
Tratamiento médico			
Antiagregante	36 (38%)	4 (19%)	0.094
Anticoagulante	21 (22%)	8 (38%)	0.133
B Bloqueante	27 (29%)	9 (43%)	0.207
Ca Antagonista	14 (15%)	3 (14%)	1.000
IECA	16 (17%)	9 (43%)	0.021
Estatinas	37 (39%)	5 (24%)	0.181
AINES	6 (6%)	0 (0%)	0.289
Corticoides	2 (2%)	0 (0%)	0.667
Diuréticos	36 (38%)	13 (62%)	0.048
ARA II	9 (10%)	1 (5%)	0.421

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.
AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.
ARA II: Antagonista de los receptores de la angiotensina II.

Dentro de los parámetros analíticos no encontramos diferencias entre ambos grupos de pacientes. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo, tanto medida con método ecocardiográfico (60 vs 42; p<0.001), como medida mediante ventriculografía (57±9 vs 40±14; p<0.001), fue superior en el grupo de estenosis aórtica. También encontramos que los gradientes aórticos, tanto máximo (77±21 vs 33±17; p=0.001), como medio (47±14 vs 24±11; p=0.041) fueron superiores en este grupo de pacientes (**Tabla 21**).

Tabla 21 . Comparación de las pruebas complementarias en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso

Estenosis aórtica degenerativa			
Variable	Si (n=94)	No (n=21)	p

Datos analíticos			
Creatinina plasmática, mg/dl	0.9 (0.8-1.1)	1.0 (0.83-1.26)	0.203
Colesterol total, mg/dl	185±39	168±31	0.122
Colesterol HDL, mg/dl	51±13.5	46±10	0.352
Colesterol LDL, mg/dl	105±29	100±25	0.686
Triglicéridos, mg/dl	117±59	90±37	0.106
Calcio, mg/dl	9.7 (9.2-9.9)	9.6 (8.8-9.8)	0.432
Número de leucocitos, /mm ³	6360 (5345-7390)	6975 (5660-9090)	0.155
Fibrinógeno, mg/dl	292±106	323±177	0.203
Variables ecocardiográficas			
FEVI, %	60 (57-64)	42 (30-59)	<0.001
Gradiente máximo, mmHg	77±21	33±17	0.001
Gradiente medio, mmHg	47±14	24±11	0.041
Variables coronariografía			
Lesión coronaria significativa	39 (43%)	9 (45%)	0.861
FEVI, %	57±9	40±14	<0.001

PCR: Proteína C Reactiva.

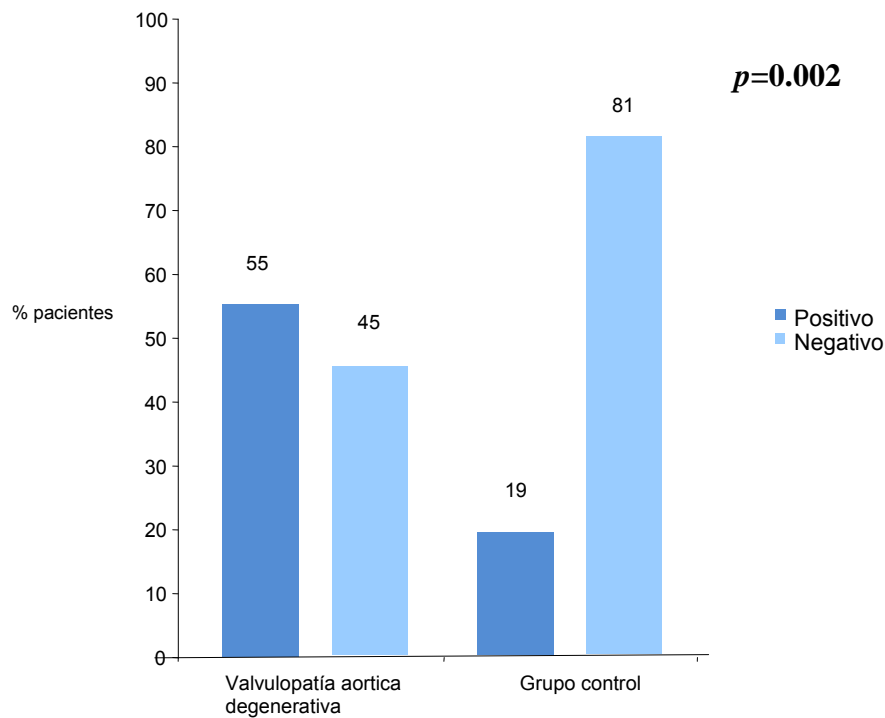
Pro BNP: Péptido natriurético tipo B

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

Hubo un mayor crecimiento de nanopartículas en los cultivos de las válvulas aórticas de los pacientes con estenosis aórtica, respecto a los cultivos de las válvulas del grupo sin valvulopatía aórtica degenerativa (55% vs 19%; $p=0.002$). (**Tabla 22**).

Tabla 22. Comparación del resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el grupo de pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa con el resto de los pacientes

Estenosis aórtica			
Variable	Si (n=94)	No (n=21)	p
Cultivo de las válvulas aórticas			
Cultivo positivo, %	52 (55%)	4 (19%)	0.003



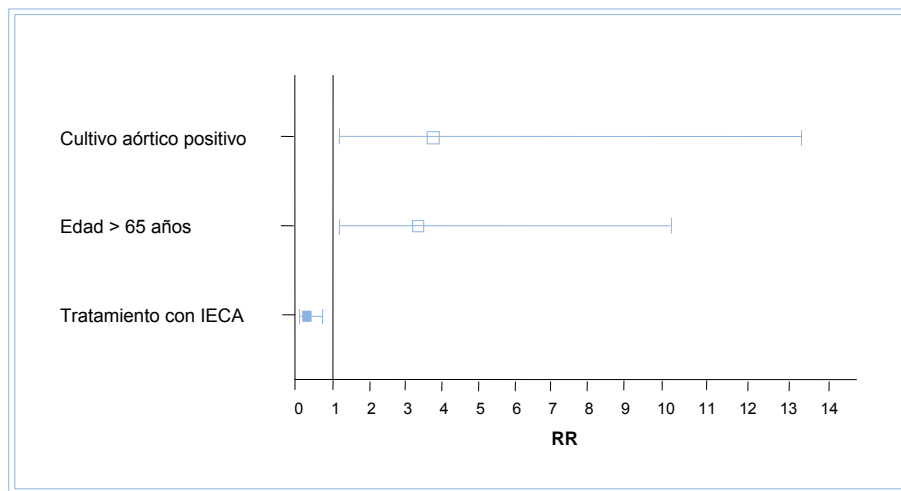
4.5.2. Análisis multivariado de la estenosis aórtica

Se introdujeron en el modelo de regresión logística las variables que, en el análisis univariado tenían significación estadística, y no se encontraban correlacionadas entre sí. Además, se incorporó a este análisis la variable antecedente personal de dislipemia, por considerarse de interés clínico. Permanecieron en el modelo final la presencia de **cultivo aórtico positivo, edad > 65 años y la ausencia de tratamiento con IECA (Tabla 23)**. De este modo, la presencia de las nanopartículas, tener una edad superior a los 65 años, y no estar en tratamiento con IECA se asocian de forma independiente, en nuestra muestra, con la presencia de estenosis aórtica severa degenerativa.

Tabla 23. Variables que permanecen en el modelo de análisis multivariado en la valvulopatía aórtica degenerativa

Variable	RR	IC95%	P
Cultivo aórtico positivo	3.939	1.170-13.263	0.027
Edad >65 años	3.418	1.143-10.224	0.028
Antecedente de dislipemia	2.026	0.627-6.547	0.238
Tratamiento con diuréticos	0.388	0.119-1.268	0.117
Tratamiento con IECAs	0.242	0.077-0.760	0.015

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina



4.6 Factores predictores de crecimiento de nanopartículas en la estenosis aórtica degenerativa

4.6.1. Análisis univariado

Finalmente realizamos, dentro del grupo de pacientes con estenosis aórtica degenerativa, el análisis univariado del grupo de pacientes con cultivo aórtico positivo, para determinar qué factores eran predictores del crecimiento de las nanopartículas en las válvulas (**Tablas 24 a 26**).

Cuando se compararon las variables demográficas y clínicas entre los dos grupos, observamos que los pacientes con cultivo aórtico positivo eran con mayor proporción hombres (69% vs 45%; $p=0.019$), y hubo un mayor porcentaje de enolismo como antecedente personal (10% vs 0%; $p=0.047$) (**Tabla 24**).

Tabla 24. Comparación de los parámetros demográficos y clínicos en relación con el cultivo aórtico

Cultivo aórtico positivo			
Variable	Si (n=52)	No (n=42)	P
Variables demográficas			
Sexo			
Varón	36 (69%)	19 (45%)	0.019
Edad, años	71±8	72±7	0.423
Factores de riesgo cardiovascular			
Antecedentes de tabaquismo	2 (4%)	1 (2%)	0.580
Hipertensión arterial	27 (52%)	27 (64%)	0.228
Dislipemia	21 (40%)	21 (50%)	0.351
Diabetes mellitus	10 (19%)	13 (31%)	0.189
Comorbilidad			
Antecedentes de CI	9 (17%)	8 (19%)	0.828
Revascularización coronaria	6 (12%)	5 (12%)	1.000
Antecedentes familiares de CI	1 (2%)	0 (0%)	0.548
Enfermedad vascular periférica	7 (14%)	5 (12%)	0.822
Accidente cerebrovascular agudo	4 (8%)	3 (7%)	1.000
Hepatopatía	3 (6%)	1 (2%)	0.403
Enolismo	5 (10%)	0 (0%)	0.047
EPOC	6 (12%)	3 (7%)	0.713
Hiperuricemia	6 (12%)	3 (7%)	0.713

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
CI: Cardiopatía isquémica.

No observamos diferencias en la frecuencia de los fármacos empleados en los pacientes con cultivo aórtico positivo en comparación con el tratamiento de los pacientes con cultivos negativos (**Tabla 25**).

Tabla 25. Comparación del empleo de fármacos en relación con el resultado del cultivo de la válvula aórtica en el momento de ingreso

Cultivo aórtico positivo			
Variable	Si (n=52)	No (n=42)	p
Tratamiento médico			
Antiagregante	20 (38.5%)	16 (38%)	0.971
Anticoagulante	14 (27%)	7 (17%)	0.235
B Bloqueante	17 (33%)	10 (24%)	0.344
Ca Antagonista	8 (15%)	6 (14%)	0.882
IECA	8 (15%)	8 (19%)	0.638
Estatinas	18 (35%)	19 (45%)	0.295
AINES	4 (8%)	2 (5%)	0.445
Corticoides	2 (4%)	0 (0%)	0.303
Diuréticos	22 (42%)	14 (33%)	0.374
ARA II	4 (8%)	5 (12%)	0.736

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

ARA II: Antagonista de los receptores de la angiotensina II.

Dentro de las distintas pruebas complementarias no observamos ninguna diferencia en los datos analíticos, así como en el resto de parámetros ecocardiográficos y angiográficos (**Tabla 26**).

Tabla 26 . Comparación de las pruebas complementarias en relación con el resultado del cultivo de la válvula aórtica en el momento del ingreso

Cultivo aórtico positivo			
Variable	Si (n=52)	No (n=42)	p
Datos analíticos			
Creatinina plasmática, mg/dl	0.9 (0.8-1.1)	1.0 (0.8-1.13)	0.763
Colesterol total, mg/dl	190±35	179±43	0.203
Colesterol HDL, mg/dl	52±16	51±12	0.832
Colesterol LDL, mg/dl	112±25	98.5±32	0.141
Triglicéridos, mg/dl	118±71	115±39	0.796
Calcio, mg/dl	9.6 (9.2-9.96)	9.7 (9.3-9.9)	0.461
Número de leucocitos, /mm³	6560 (5370-7500)	6240 (5163-7665)	0.452
Fibrinógeno, mg/dl	292±110	293±103	0.990

Variables ecocardiográficas			
FEVI, %	60 (56-64)	60 (50-62)	0.239
Gradiente máximo, mmHg	76±19	78±23	0.746
Gradiente medio, mmHg	46±12	48.5±20	0.623
Área valvular aórtico, cm ²	0.7 (0.6-0.9)	0.8 (0.7-0.9)	0.275
Variables coronariografía			
Lesión coronaria significativa	23 (45%)	16 (40%)	0.626
FEVI, %	58±9	56±10	0.476

PCR: Proteína C Reactiva.

Pro BNP: Péptido natriurético tipo B

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

4.6.2. Análisis multivariado

Finalmente, cuando se introdujeron las variables con significación estadística en el análisis univariado, y no correlacionadas entre sí, además del antecedente de dislipemia, en el modelo de regresión logística, únicamente permaneció en el modelo final la variable sexo masculino (**Tabla 27**).

Tabla 27. Variables que permanecen en el modelo de análisis multivariado

Variable	RR	IC95%	P
Sexo masculino	2.648	1.134-6.183	0.024

4.7 Análisis metabólico del medio de cultivo de válvulas con crecimiento de nanopartículas vs medio DMEM.

Para investigar el posible origen biológico de las nanopartículas se seleccionaron de forma aleatoria 6 pacientes de la muestra total con válvulas con crecimiento positivo, y se analizaron los perfiles metabólicos de ^1H -RM de los medios de cultivo de las nanopartículas.

Las características demográficas, clínicas y ecocardiográficas y los datos bioquímicos de la población total, y de los pacientes incluidos en este sub-análisis se presentan en la **Tabla 28**. Todos los datos basales de ambos subgrupos fueron similares. Tan sólo se observó una tendencia favorable al sexo masculino (el 65 frente al 100%; $p = 0,08$) en cuanto al grupo de pacientes seleccionados con cultivos positivos.

Tabla 28. Características del grupo total y de las válvulas seleccionadas con nanopartículas calcificantes positivas

Área valvular aórtica (cm ²)	0.79 (± 0.04)	0.77 (± 0.12)	0.90
Variables analíticas	Total	Válvulas seleccionadas	p
Colesterol total (mg/dL)	182 (± 5.6)	188 (± 12.8)	0.474
cHDL (mg/dL)	51 (± 1.8)	59 (± 7)	0.38
cLDL (mg/dL)	104 (± 4)	97 (± 1)	0.74
Triglicéridos (mg/dL)	113 (± 5.7)	106 (± 12.2)	0.954
Valvulas (n)	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.8-1.38)	0.69
Edad (años)	71 (66-76)	75 (69-77)	0.53
Calcio (mg/dL)	9.7 (9.2-9.9)	8.7 (8.2-9.6)	0.39
Varones	75 (65)	6 (100)	0.08
Recuento de leucocitos ($\times 10^9/\text{L}$)	6.4 (5.4-7.6)	6.9 (6.3-8.4)	0.20
Presión arterial sistólica (mmHg)	130 (± 1.7)	129 (± 6.6)	0.99
Fibrinógeno (mg/dL)	298 (± 12)	296 (± 51)	0.99
Presión arterial diastólica (mmHg)	65 (± 1.2)	66 (± 5.3)	0.83
Tabaquismo	11 (10)	1 (17)	0.93
Hipertensión	65 (57)	5 (83)	0.29
Diabetes	28 (24)	1 (17)	0.54
Dislipemia	48 (42)	4 (67)	0.39
Enfermedad coronaria angiográfica	48 (42)	1 (17)	0.20
Tratamiento médico			
Antiagregantes	40 (35)	2 (33)	0.61
Anticoagulantes	29 (25%)	1 (17%)	0.41
Bloqueadores Beta	36 (31)	3 (50)	0.58
Antagonistas del calcio	17 (15)	0 (0)	0.25
IECA	25 (22)	0 (0)	0.15
Estatinas	42 (37)	2 (33)	0.57
Diuréticos	49 (43)	2 (33)	0.24
Variables ecocardiográficas			
Gradiente máximo transvalvular (mm Hg)	75 ($\pm 2,7$)	77 ($\pm 8,3$)	0.902

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; CLDL: colesterol unido a proteínas de baja densidad; IECA: inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina.

Las variables discretas se presentan en forma de proporciones, n (%). Las variables continuas se presentan en forma de media \pm error estándar de la media y medianas [percentiles 25-75].

Después de 6 semanas en cultivo, se formaron nanopartículas en forma de una película adherida a la superficie de plástico, como describimos con anterioridad. Los medios de cultivo se mantuvieron claros y no se apreció ningún olor especial, ni ninguna otra característica que pudiera asociarse a un crecimiento bacteriano. En la **figura 8** se muestran los espectros de RM de los medios obtenidos después de 6 semanas de cultivo de las nanopartículas, los medios de control envejecidos durante 6 semanas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, y los medios procedentes de un cultivo contaminado. Los espectros de los medios envejecidos y de los cultivos de CNP resultaron similares (**Figuras 8 A y B**), sin que se aprecie ningún metabolito/pico específico que permita diferenciarlos.

En cambio, los espectros de los medios contaminados (**Figura 8 C**) presentaron picos en 1,16 y 1,40 ppm, que se asignaron de forma preliminar a los ácidos alfacetoisovalérico y dimetilmalónico, respectivamente, que no se hallaron en los otros dos medios.

Los demás metabolitos identificados fueron compatibles con los presentes en la formulación de los medios de cultivo de DMEM. Los picos más grandes de los espectros correspondían a la glucosa. Otros metabolitos identificados fueron lactato, lisina, glutamina, piruvato y tirosina. Pudimos identificar también la presencia de acetato y formiato, compuestos que aparecían en los medios envejecidos, con independencia de la presencia de CNP, pero no en los medios recientes.

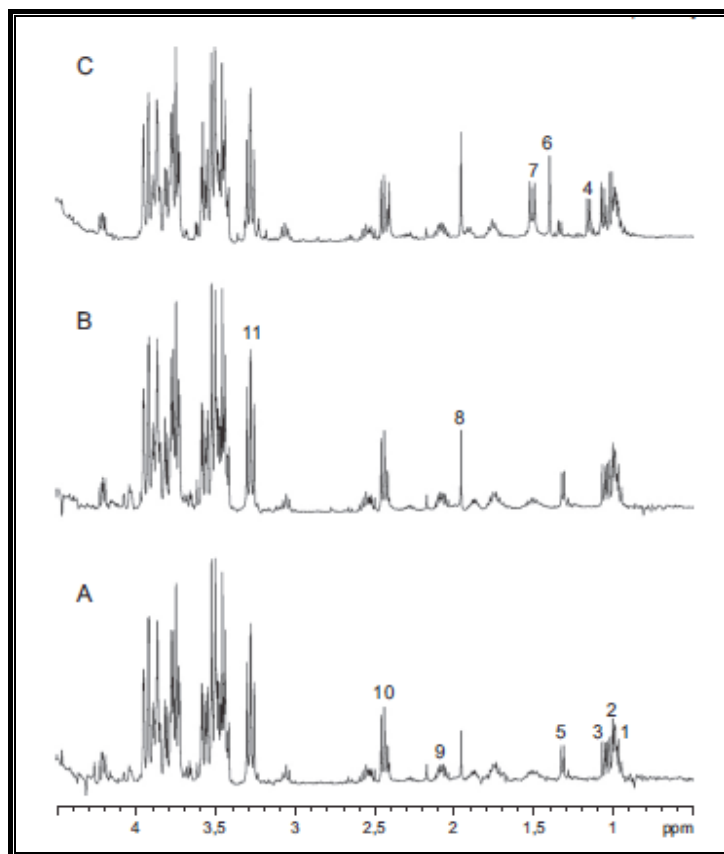


Figura 8: Espectros de ^1H -RMN de medios estériles envejecidos (A), medios de cultivo después de 6 semanas de crecimiento de CNP (B) y medios contaminados (C). La asignación preliminar de los picos, basada en la desviación química solamente, es la siguiente: 1, isoleucina; 2 y 3, valina; 4, ácido alfacetoisovalérico; 5, lactato; 6, ácido dimetilmalónico; 7, alanina; 8, acetato; 9 glutamato/glutamina; 10, glutamato; 11, glucosa.

Con objeto de investigar si había diferencias poco manifiestas entre los medios de control y de CNP, utilizamos en método de análisis de componentes principales (ACP) de reconocimiento de patrones sin supervisión. En la **Figura 9** se muestra el gráfico de puntuación de ACP, en el que cada punto corresponde a una muestra individual. La única muestra que se encuentra dentro del intervalo de confianza del 95% es la correspondiente a la muestra contaminada (señalada con un asterisco en el gráfico). No se apreció agrupación alguna de las muestras que nos permitiera diferenciar los medios envejecidos de los medios de cultivo de CNP, lo cual respalda la ausencia de diferencias entre los dos conjuntos de medios.

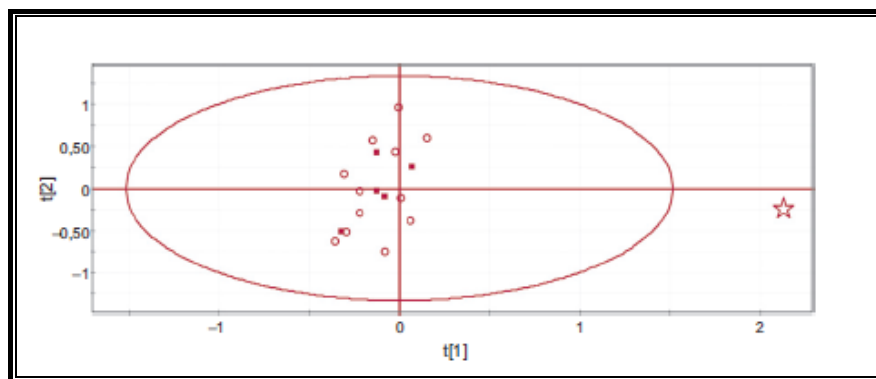


Figura 9: Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales del conjunto de datos de espectros. Cada punto corresponde a un cultivo individual. Los cuadrados corresponden a medios de cultivo envejecidos; los círculos a medios procedentes de cultivos de CNP, y la estrella, a medios contaminados.

4.8 Análisis genético del medio de cultivo de válvulas con crecimiento de nanopartículas.

Para comprobar que los cambios en los medios envejecidos no estaban en relación con la presencia de microorganismos bacterianos conocidos, se realizó una serie de análisis en busca de detección de material genético tanto en el medio de cultivo de las válvulas, como en el medio de control envejecido. Se evaluaron los medios de cultivo mediante la determinación de la presencia de gen bacteriano 16sRNA. Los resultados en el medio de cultivo con crecimiento no diferían de los resultados obtenidos en el control negativo (**Figura 10**).

Por lo que finalmente todas las muestras evaluadas se consideraron negativas para la presencia de microorganismos bacterianos.

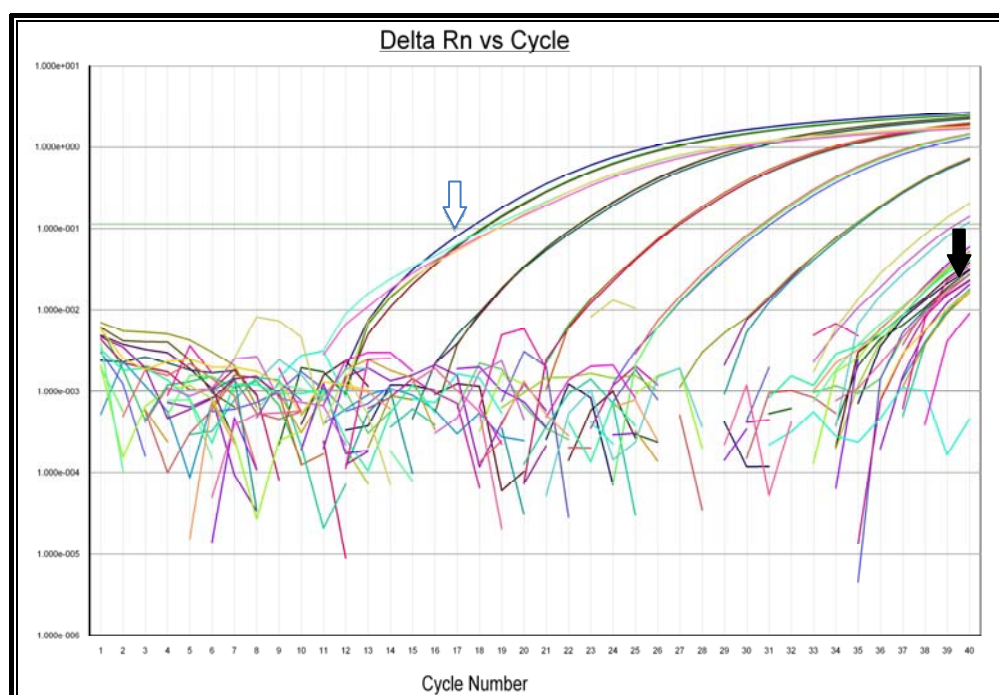


Figura 10: Gráficos de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real de medios de cultivo de CNP con controles positivos (flecha blanca), cultivos de CNP y controles negativos (flecha negra) y una curva estándar entre 107 y 102 copias. Todas las muestras y los controles negativos tienen valores de TC superiores a 40.

Capítulo 5

Discusión

5.1. Idea principal

El principal hallazgo de esta tesis ha sido mostrar la presencia de las nanopartículas calcificantes en las válvulas calcificadas de los pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa. Existen trabajos previos que también lo afirmaban, sin embargo, dichos trabajos se encuentran limitados por el pequeño número de pacientes incluidos ^{152,157}. Además, hemos descrito que las nanopartículas se encontraban presentes en mayor proporción en los cultivos de las válvulas calcificadas de pacientes con estenosis aórtica, en comparación con las válvulas empleadas como controles. Por tanto, por primera se apunta una relación causal entre nanopartículas y calcificación en la estenosis aórtica ¹⁷⁵.

Esta tesis también ha abordado la cuestión específica en relación con la naturaleza de las nanopartículas calcificantes como entes vivos, a través de señales de su metabolismo en los medios de cultivo. Sean cuales fueren su naturaleza y su composición química, los organismos vivos “preservan su orden interno tomando del entorno energía libre, en forma de nutrientes o luz solar, devolviendo al entorno una cantidad igual de energía en forma de calor y entropía” ¹⁷⁶. Los resultados de esta tesis no mostraron actividad metabólica alguna que hubiese podido relacionarse directamente con el crecimiento de las nanopartículas calcificantes. En consecuencia, no las nanopartículas calcificantes no deberían ser consideradas organismos vivos según la definición utilizada en el presente trabajo ¹⁷⁷.

5.2. Factores de riesgo asociados a la estenosis aórtica

5.2.1. Factores de riesgo asociados con la estenosis aórtica.

Los factores de riesgo asociados con la estenosis aórtica observados en el presente trabajo están influenciados por el tipo de pacientes que conformaban el grupo control, ya que se trataba de pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente por presentar insuficiencia aórtica significativa, y a los que se realizó un trasplante cardiaco. Por esta razón se explica que el sexo masculino no se relacione con el desarrollo de estenosis aórtica en nuestra experiencia cuando la mayoría de trabajos previos han mostrado lo contrario. En el mayor trabajo publicado hasta la fecha, Novaro GM y cols ¹⁸ analizaron los datos de 5621 participantes en un estudio observacional multicéntrico, y entre los diferentes predictores de desarrollo de estenosis aórtica, el sexo masculino se asoció con un 32% de incremento de riesgo. Además del sexo masculino, en nuestro trabajo encontramos diferentes fármacos que no se asociaron con el desarrollo de estenosis aórtica. Entre los más destacados sobresalieron los IECAs. Como ha sido descrito en la introducción, el sistema renina-angiotensina ha sido implicado en la patogénesis de la lesión valvular aórtica ^{70,76}. En la lesión valvular existen diversas fuentes de producción de angiotensina II. Esta molécula, a través del receptor AT₁, estimula la inflamación y el estrés oxidativo ^{78,79}. De este modo se ha sugerido que el tratamiento con IECAs podría tener un papel en el tratamiento médico de la estenosis aórtica. En nuestro trabajo, el tratamiento con IECAs no resultó ser un factor protector del desarrollo de estenosis aórtica. No obstante, hay que señalar que el grupo control está formado por pacientes que, por ambas patologías que presentaban de base, precisaban seguir un tratamiento crónico con IECAs. Por tanto, serán necesarios en un futuro nuevos estudios en relación con este tema.

En el presente trabajo no se ha encontrado ningún vínculo entre la dislipemia y la estenosis aórtica. Prácticamente la mayoría de estudios observacionales han confirmado la asociación de este factor con la estenosis aórtica ^{49,73,74, 111}. No obstante, en esta tesis una parte importante del grupo control estaba formado por pacientes con cardiopatía isquémica crónica y avanzada, donde la dislipemia es un factor de riesgo importante. De hecho al comparar los diferentes grupos, en el grupo de la insuficiencia aórtica pura, que lo podríamos considerar en este caso como un grupo

control, ya que la dislipemia no se asocia con la insuficiencia aórtica, presentaba un menor porcentaje de dislipemia en comparación con el resto de grupos.

En cambio, el crecimiento de las nanopartículas se encontró presente en mayor proporción en los cultivos de las válvulas calcificadas de los pacientes con estenosis aórtica, en comparación con los cultivos de las válvulas del grupo control. Por primera vez, esta tesis evidencia que las nanopartículas podrían estar relacionadas con la patogenia de la estenosis aórtica degenerativa en los seres humanos. Los artículos previos que describían una asociación entre las nanopartículas y la estenosis aórtica, se encontraban condicionados por el pequeño número de pacientes incluidos y , además, esos trabajos se limitaban a ser trabajos puramente descriptivos, sin grupos control ^{152,157}. En nuestra tesis, hemos encontrado que las nanopartículas calcificantes se encontraban presentes en mayor proporción en los cultivos de las válvulas calcificadas de los pacientes con estenosis aórtica, en comparación con las válvulas empleadas como controles. Por tanto, dados nuestros resultados, y la asociación de las nanopartículas con otras patologías calcificantes, sugerimos que las nanopartículas podrían participar en la patogenia de la estenosis aórtica ¹⁷⁵.

5.2.2. Factores predictores relacionados con el crecimiento de las nanopartículas en las válvulas aórticas.

El único factor predisponente del crecimiento de las nanopartículas en los medios de cultivo de válvula aórtica con estenosis en nuestra tesis fue el sexo masculino. La relación entre el sexo masculino y calcificación ya había sido descrita previamente tanto en la valvulopatía aórtica, como en la aterosclerosis. Ortlepp et al ⁵² describieron que los hombres tenían un mayor grado de calcificación de las válvulas aórticas al compararlas con las mujeres, y, además, afirmaron que el mayor grado de calcificación era independiente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Nordström et al ⁵¹ describieron que determinados polimorfismos del receptor de estrógeno alpha y TGF beta 1 se encontraban en relación con la patogenia de la estenosis aórtica a través del metabolismo lipídico.

También existen otros trabajos que relacionaron las hormonas sexuales con la patogenia de la aterosclerosis. Ouyang et al ¹⁷⁸ apoyaron una asociación entre la testosterona y el aumento del espesor de la capa íntima-media de la arteria carótida.

Esta asociación también resultó independiente de la edad y de los factores de riesgo cardiovascular clásicos (lípidos, tabaco, hipertensión arterial, índice de masa corporal, y la sensibilidad a la insulina). Existen receptores de hormonas sexuales en las células endoteliales de la pared arterial, en los macrófagos y megacariocitos, y en las plaquetas ¹⁷⁹. La testosterona podría aumentar la respuesta inflamatoria del endotelio, al estimular la captación por parte de los macrófagos de LDL acetilada, y la adhesión de los monocitos al endotelio vascular ¹⁸⁰. Por tanto, las hormonas sexuales podrían tener efectos directos en los vasos sanguíneos, así como en las válvulas cardíacas. Además, podría haber una relación entre las hormonas sexuales y la patogenia de la calcificación. Como hemos descrito previamente, la osteoprotegerina, una molécula de señalización implicadas en la actividad osteoblástica y osteoclástica en la remodelación ósea, ha sido implicada con la calcificación intravascular ¹⁸¹, ya que su concentración se encuentra aumentada en las placas calcificadas de las arterias coronarias ¹⁸². Se ha descrito que existe una relación inversa entre los niveles de testosterona y la osteoprotegerina en hombres ¹⁸³, y que esta relación no existe en las mujeres ¹⁸⁴. No obstante, al realizar una ovariectomía, se producía una disminución en la producción ovárica de testosterona y estradiol, y también se incrementó el aumento vascular de osteoprotegerina / RANKL (ligando activador del receptor del receptor nuclear NF kappa beta) en modelos animales ¹⁸⁵. Asimismo, la testosterona disminuye la respuesta inflamatoria en células endoteliales humanas inducida por el factor de necrosis tumoral alpha ¹⁸⁶.

5.2.3. Análisis de factores en los diferentes grupos

Al comparar las características de los distintos grupos, hemos encontrado diferencias relativas a las diferentes características de cada patología que conforma cada grupo. De este modo se explicaría que los pacientes del grupo 3 tuviesen una peor fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), así como una mayor necesidad de tratamiento con anticoagulantes, datos característicos de pacientes con insuficiencia valvular con sobrecarga de volumen. También resulta lógico que los pacientes del grupo 4 tuviesen una FEVI claramente inferior al resto de los grupos, una mayor proporción antecedentes de hábito tabáquico y de revascularización coronaria, y un mayor número de leucocitos en el hemograma. El mayor número de leucocitos en el contexto de enfermedades cardiovasculares avanzadas también ha sido descrito con anterioridad, e incluso ha sido relacionado con el pronóstico de este tipo de pacientes ¹⁸⁷.

Entre todas las diferencias descritas habría que destacar la mayor proporción de crecimiento de nanopartículas calcificantes en los cultivos de las válvulas del grupo 2. Una explicación plausible de este hallazgo sería el mayor estrés que soportarían las células endoteliales de las válvulas aórtica, ya que al estrés de un alto gradiente de flujo transaórtico por la estenosis aórtica, habría que sumar el estrés del flujo turbulento del chorro de insuficiencia aórtica. Existe un escaso número de artículos en la bibliografía que comprueben esta hipótesis en valvulopatía aórtica. No obstante, como se ha descrito en la introducción, el estrés que sufren las células endoteliales podría ser un factor inicial de la lesión de la valvulopatía aórtica. De hecho, la calcificación del velo valvular ocurre inicialmente en el lado aórtico de los velos, donde el flujo es más turbulento ⁴⁵. Butcher JT et al ¹⁸⁸ describieron en un interesante artículo la influencia del estrés de flujo en las células endoteliales de válvulas aórticas, que reducía la transcripción de genes antiinflamatorios y antioxidantes, y que incrementaba la transcripción de genes promotores de la calcificación, como por ejemplo BMP4, CAD11, y POSTN. En relación con la aterosclerosis se ha constatado que las lesiones ateroscleróticas habitualmente son focales, de manera que las fuerzas hemodinámicas podrían tener un papel fundamental en su desarrollo ¹⁸⁹. En cambio, en la aterosclerosis existen un gran número de trabajos que han detallado la gran importancia del papel del estrés de flujo en el endotelio vascular, sobre todo a nivel de las bifurcaciones. A diferencia de lo inicialmente se podría suponer, las lesiones focales de aterosclerosis tenían lugar en zonas donde la media del índice de estrés de flujo es bajo, y el índice de oscilación del estrés es alto ^{189, 190, 191}. Esta explicación podría justificar el mayor crecimiento de las nanopartículas en pacientes con doble lesión aórtica, ya que existiría una mayor activación del endotelio valvular debido a las características del estrés del flujo turbulento a las que estarían sometidas y, finalmente, a un mayor grado de calcificación del tejido. En el presente trabajo no hemos realizado este análisis por no disponer de datos objetivos de la cuantificación de calcio de la válvula aórtica. Para realizar una comparación de este tipo serían necesarios los datos obtenidos mediante tomografía computerizada (TC) con multidetector, que es la prueba más sensible para cuantificar la cantidad de calcio valvular ^{192, 193}. En el momento que se realizó la tesis no disponíamos en nuestro centro hospitalario de la técnica mediante TC multidetector, ni contábamos con el software necesario para la cuantificación de calcio. Por tanto, sería interesante confirmar esta hipótesis con la realización de nuevos estudios en relación con este tema.

5.3. Naturaleza de las nanopartículas.

Existe una importante controversia en relación con la naturaleza de las CNPs. No está claro si estas partículas son microorganismos vivos o, simplemente, partículas inertes ^{194, 195}.

5.3.1 Determinación de material genético

En nuestra tesis no se ha aislado DNA o RNA de estas partículas mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), al igual que en los últimos trabajos publicados ^{94,133}.

Realmente no existe ninguna definición universalmente aceptada de organismo vivo. Una definición que ha calado profundamente en el mundo científico es la teoría celular. Esta teoría establece que los organismos están compuestos de una o más células. El concepto moderno de esta teoría se podría resumir en lo siguiente: Todas las células provienen de otras células preexistentes; en su interior es donde se producen las funciones vitales de un organismo; y las células contienen información hereditaria necesaria, en forma de un ácido nucleico, para regular las funciones de homeostasis de la célula, y para transmitir dicha información a la siguiente generación. No obstante, se han publicado varios trabajos que han cuestionado el concepto del gen como unidad de vida ^{196,197}. Otra teoría que ha ganado especial reconocimiento en la comunidad científica en el último siglo, es la teoría sobre el origen de la vida. Esta teoría afirma que el germen de la vida podría haber comenzado con células primordiales heterótroficas muy simples, a modo de una simple vesícula rodeada de una membrana. Esta membrana permitiría o promovería una serie de reacciones químicas simples a su través, de manera que las propiedades químicas en el interior serían diferentes de las propiedades del exterior ¹⁹⁸. Una continua evolución de este proceso conllevaría a una mayor complejidad, adquiriendo la posibilidad de dividirse y, finalmente, a la formación de ácidos nucleicos simples, como método de transmisión de información. Según esta teoría, las primeras células primitivas carecían de ácidos nucleicos, pero se podrían considerar como un organismo vivo. Por tanto, algunos grupos que defienden que las nanopartículas calcificantes son organismos vivos, han descrito a las nanopartículas calcificantes como análogos de esos sistemas primitivos, carentes de ácidos nucleicos, pero con

capacidad de poder crecer en unas determinadas condiciones ambientales, con capacidad de precipitar hidroxiapatita, y con capacidad de dividirse y de mantener sus características durante generaciones ¹⁵³.

5.3.2 Metabolismo de las nanopartículas

La metabolómica puede considerarse en la actualidad la ciencia -ómica más emergente. Permite obtener un perfil metabólico de una muestra biológica compleja a través de la combinación de técnicas analíticas que generan gran cantidad de datos y del análisis estadístico multivariante de ellos. La metabolómica deja a un lado los métodos tradicionales y reduccionistas centrados en el estudio del efecto de un solo componente sobre un sistema biológico. Mediante esta técnica se exploran a nivel molecular los efectos de múltiples factores sobre un sistema biológico. La metabolómica permite analizar una gran cantidad de metabolitos en matrices complejas como biofluidos y tejidos de manera automatizada y relativamente rápida.

Si las nanopartículas calcificantes fuesen organismos vivos dejarían algunas señales de su metabolismo en los medios de cultivo, independientemente de su naturaleza y su composición química. Se ha señalado que las nanopartículas calcificantes tenían escaso metabolismo, y que su tasa de duplicación se encontraba entre los 2 y 5 días ¹³⁸; también se ha demostrado que presentaban actividad de la enzima deshidrogenasa ¹⁹⁹; y que incorporaban ³⁵S-metionina ¹⁹⁵.

Sin embargo, en el presente trabajo no detectamos actividad metabólica alguna en nuestras muestras. Los equipos de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución permiten realizar una exploración de todos los analitos de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en distintos tipos de biofluidos (ej. suero y/o orina), o en tejidos, tanto de humanos como de modelos animales. La presencia de acetato se ha asociado al crecimiento bacteriano en el caso de los espectros de RM obtenidos a partir de abscesos in vivo ²⁰⁰, pero en el caso del cultivo de nanopartículas calcificantes esto se descartó debido a la ausencia de 16sRNA en los medios de cultivo. Aunque algunos autores habían indicado que las nanopartículas calcificantes inhiben la reacción en cadena de la polimerasa ¹⁹⁵, posteriormente se ha descrito que tal afirmación no es cierta ²⁰¹.

5.3.3 Hipótesis de la naturaleza de las nanopartículas

Nuestros resultados respaldan los datos recientemente publicados que indican que las nanopartículas calcificantes son una combinación de sales y proteínas del suero ¹³⁷, que podrían formarse mediante un proceso no biológico ²⁰².

En estos sistemas, la presencia de cristales podrían actuar como centros de nucleación y facilitarían la formación de las mismas. Cisar et al ¹³³ llegaron a la conclusión de que la biomineralización atribuida a las nanobacterias era iniciada por macromoléculas no vivas. Posteriormente, Raoult et al ¹³⁷ llevaron a cabo un análisis exhaustivo con *Nanobacterium* sp., y llegaron a la conclusión de que las nanobacterias eran «complejos proteicos minerales autopropagados que contienen fetuína como principal componente biológico». Martel et al ¹⁴⁹ también han respaldado el origen no biológico de las partículas de tipo nanobacteria. Además, la mayor parte de los trabajos que han descrito a las nanopartículas calcificantes se basaron en datos morfológicos obtenidos mediante microscopía electrónica. Recientemente se ha demostrado que existen mecanismos de crecimiento de cristales poco habituales, como son los precipitados de witherita a partir de soluciones de sílice y cloruro de bario, y que la morfología de estos cristales se parecían mucho a organismos primitivos. Por tanto, la evidencia de vida no puede basarse únicamente en la morfología ²⁰³.

La hipótesis de que las nanopartículas calcificantes sean un organismo vivo es muy atractiva desde el punto de vista clínico. En modelos animales, se ha observado que una endocarditis crónica de bajo grado o recurrente con bacterias calcificantes, podría ser la causa de la calcificación de la válvula aórtica ⁷⁵. Por tanto, según esta hipótesis, el tratamiento antibiótico y la vacunación podrían tener un efecto protector respecto al desarrollo de la estenosis aórtica. Todo ello en consonancia con lo indicado por estudios previos, que habían señalado un efecto beneficioso del tratamiento combinado de EDTA y tetraciclinas en la reducción de la calcificación arterial vascular ¹⁵⁵.

Nuestras observaciones van en favor de una interpretación alternativa de la biomineralización de las nanopartículas, pero no reducen la importancia de realizar nuevos trabajos para definir la base que subyace a la calcificación extraósea patológica. La concentración de proteínas y fosfato en la sangre humana está justo por debajo del umbral en el que empieza a formarse el precipitado de hidroxipatita. Por lo que los factores que facilitasen el depósito de calcio podrían tener efectos clínicos adversos.

5.4. Hipótesis derivada de nuestra tesis: la fisiopatología de la estenosis aórtica severa.

5.4.1 Fetuina-A

5.4.1.1 Papel fisiológico de la fetuina-A

La fetuina-A es una proteína que fue descrita por primera vez como la principal globulina del suero de ternera fetal y neonatal. Se trata de una proteína con un peso molecular de 58 kDa, que se sintetiza por los hepatocitos, y puede alcanzar concentraciones séricas elevadas ²⁰⁴. Pertenece a la superfamilia de las cistatinas, que son unas proteínas inhibidoras de las cisteína-proteasas. Se encuentra ampliamente distribuida en el espacio extracelular, sobre todo en el tejido óseo, donde alcanza una importante concentración.

La fetuina-A ha sido identificada como un potente inhibidor circulante del proceso de calcificación en los tejidos ²⁰⁵. Puede ejercer su efectos mediante varios mecanismos de acción. El primer mecanismo es la inhibición de la formación de hidroxiapatita al reducir su cristalización ²⁰⁶, mediante la formación de un complejo de alto peso molecular con mineral de fosfato cálcico y la proteína ácido γ -carboxiglutámico de la matriz (MPG), un regulador clave de la calcificación de los tejidos ²⁰⁷. También antagoniza el crecimiento osteogénico, al inhibir los efectos del factor de crecimiento β , y de la BMP2, que han demostrado que promueven la calcificación valvular ^{68,82,208}. Además, la fetuina-A puede inhibir la liberación de TNF alfa, un potente regulador de la calcificación vascular y valvular ^{209,210}. A un nivel celular, la fetuina-A está implicada en la eliminación de los precipitados intracelulares ²¹¹, y en la protección de las células vasculares de músculo liso de la sobrecarga de calcio perjudicial, al aumentar la fagocitosis de las células apoptóticas, y mitigar el daño del estrés oxidativo ²¹²⁻²¹⁶.

Por todo lo anteriormente expuesto, estas propiedades de fetuina-A podrían contribuir a un posible efecto protector contra la calcificación valvular ²¹⁷.

5.4.1.2 Relación de la fetuina-A con la valvulopatía aórtica

Hay varios trabajos que han relacionado la disminución de la concentración sérica de fetuina-A con un incremento de patologías relacionadas con la calcificación ^{192,205,211,218-221}. En un modelo experimental con ratones transgénicos, la supresión del gen de la fetuina-A resultó en una calcificación progresiva y letal de tejidos blandos, tales como el riñón, los pulmones, los vasos sanguíneos, miocardio y las válvulas cardíacas ²⁰⁵. Se ha descrito que los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal, en los que la calcificación cardiovascular es común, a menudo tienen concentraciones séricas bajas de fetuina-A, y su suero mostró una capacidad reducida para inhibir la calcificación *in vitro* ²¹⁸. Finalmente, también se ha publicado que la concentración sérica de fetuina-A se relacionó de forma inversamente proporcional con la cantidad de calcio de la arteria coronaria evaluada por TC ²¹¹.

Los primeros trabajos que relacionaron una concentración sérica disminuida de fetuina-A con la patogenia de la estenosis aórtica fue en pacientes con enfermedad renal terminal ^{219,221}. No obstante, de forma reciente se ha demostrado en pacientes con la función renal normal, que los niveles séricos de fetuina-A estaban disminuidos en pacientes con estenosis valvular aórtica calcificada, en comparación con un grupo control sin estenosis aórtica ^{192,220}. Además, también se demostró que niveles séricos más reducidos de fetuina-A se asociaban con una mayor progresión de la calcificación de la válvula aórtica, así como de complicaciones cardiovasculares ²²¹.

También se ha descrito que la proteína fetuina-A está presente en las válvulas aórticas estenóticas y no en las válvulas control normales ²¹⁹. Dentro de la válvula aórtica estenótica, la fetuina-A se localiza en el interior de los focos de calcificación, y en sus bordes. Probablemente es debido a la alta afinidad de fetuina-A por la hidroxiapatita, como también se observa en el esqueleto. Esto podría resultar paradójico dadas las propiedades anticalcificantes de la fetuina-A. No obstante, estos datos también se han descrito en trabajos similares, en los que han descrito la presencia de fetuina-A en las áreas calcificadas de las arterias ateroscleróticas ^{211,222}.

5.4.2 Centros de nucleación

Estas observaciones que han relacionado la fetuina con los centros de calcificación se encuentran en consonancia con estudios previos sobre la fetuina-A, y es probable que se trate de un epifenómeno resultante de la homeostasis normal del calcio. Varios trabajos demostraron que la fetuina-A, además de actuar como un

potente inhibidor sérico de fosfato calcio, y favorecer su aclaramiento y eliminación del cuerpo, también podría funcionar como un núcleo de calcificación, cuando esta misma inhibición se ve superada. De este modo, cuando los complejos inhibidores alcanzasen el punto de saturación, los complejos macromoleculares comenzarían a agregarse, se volverían insolubles, precipitarían y se comportarían como centros o Nidi para la unión adicional de hidroxapatito hasta la formación de núcleos microscópicos de calcificación, que se han interpretado como nanopartículas ²²³. Esta explicación justificaría tanto la elevada concentración de fetuina-A que se encuentra en la matriz ósea ²²⁴, como que la importante calcificación ectópica que se asocia con la ausencia de fetuina-A en los ratones transgénicos sin gen de la fetuina-A ²⁰⁵. Dos resultados aparentemente paradójicos que pueden ser conciliarse fácilmente cuando la inhibición y la promoción de calcificación del tejido son vistos como dos caras de la misma moneda.

Por lo tanto proponemos una nueva hipótesis en la patogenia de la calcificación de la estenosis aórtica degenerativa: los complejos de alto peso molecular formados por fetuina-A, mineral de fosfato cálcico y MPG que, normalmente actúan como inhibidores de la calcificación, podrían actuar como centros de nucleación para el depósito de calcio, y posteriormente favorecerían la calcificación del tejido extracelular de la válvula aórtica. Nuestra sugerencia complementaría a la patogenia de la estenosis aórtica descrita en la introducción, y sería la siguiente:

- Los complejos de alto peso molecular podrían precipitar en la matriz extracelular cuando este mecanismo defensivo se ve superado, como por ejemplo por una elevada concentración de calcio y fosfato o en el contexto de un proceso inflamatorio ²⁰².
- Estos complejos al estar en la matriz extracelular podrían provocar o retroalimentar una respuesta inflamatoria.

De manera que la calcificación sería el resultado de dos mecanismos diferentes: uno directo, dada la capacidad de ser núcleos de calcificación de cristales de calcio en forma de cristales de apatito con concentraciones fisiológicas de fósforo y calcio; e indirectamente mediante la activación de procesos inflamatorios. De esta manera las nanopartículas, a pesar que son complejos macromoleculares de naturaleza proteica, serían capaces de estimular la formación de anticuerpos policlonales y monoclonales ²⁰², o “infectar” células fagocíticas a través de la fagocitosis o internalización mediada por un receptor ^{132,225}. Por este motivo las

nanopartículas habían demostrado tener una capacidad citotóxica para los fibroblastos ¹³² (**Figura 11**).

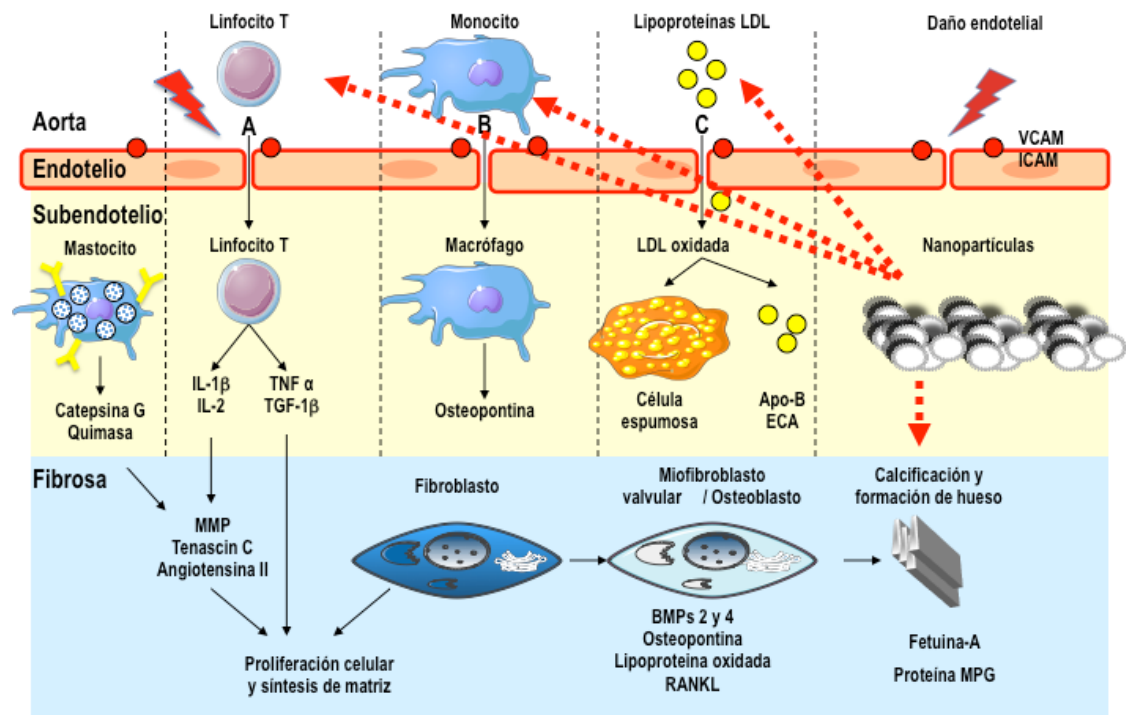


Figura 11: Gráfico en el que se muestra un resumen de la hipótesis de la etiopatogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa propuesta en nuestra tesis.

5.5. Implicaciones terapéuticas.

Las nanopartículas presentan un papel en la patogenia de la estenosis aórtica, al actuar como centros de nucleación y fomentar la calcificación, por lo que es preciso prestarles especial atención. Los avances recientes de la proteómica y la nanotecnología podrían ser útiles para proporcionar fármacos dirigidos para prevenir la calcificación y prevenir su progresión ²²⁶.

Todo esto se encuentra en consonancia con trabajos previos que habían descrito el impacto beneficioso del tratamiento combinado con EDTA y antibióticos en la reducción del nivel de la calcificación vascular arterial ¹⁵⁵.

Por lo tanto, nuestros hallazgos podrían contribuir a mejorar el tratamiento médico actual de los pacientes con estenosis aórtica degenerativa, que, como hemos visto con anterioridad en la introducción, es bastante limitado. Dado el envejecimiento actual de la población y el previsible incremento futuro de la prevalencia de la estenosis aórtica ⁸, el presente trabajo podría tener implicaciones clínicas y terapéuticas muy importantes.

No obstante, serían necesarios nuevos estudios para determinar el papel de la fetuina-A y la albúmina en la patogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa, así como el papel que podrían tener los quelantes de calcio en prevenir el desarrollo de la estenosis aórtica.

5.6. Limitaciones

En esta tesis han de reconocerse las siguientes limitaciones:

- Como hemos descrito previamente, el grupo control no es el más adecuado para comparar con la estenosis aórtica. Los pacientes que forman parte del grupo control compartían una serie de factores de riesgo comunes, al igual de una serie de tratamientos que podrían estar en relación con la patogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa. Hay que destacar la ausencia de un grupo control con pacientes sanos tanto por razones éticas, como por la ausencia de disponibilidad de válvulas aórticas sanas durante el desarrollo del trabajo en el centro hospitalario donde se llevó a cabo. No obstante, nos parece importante reseñar las diferencias entre las variables y factores de riesgo de los diferentes grupos con el objeto de entender mejor el resultado de los cultivos valvulares encontrados.

- Este estudio no ha considerado la medición de marcadores bioquímicos (BNP o NT-proBNP, PCR, fetuina-A, osteopontina, etc). Estos parámetros no se analizaban en la consulta de forma rutinaria debido a la falta de disponibilidad en el hospital al inicio del estudio. Sin duda, su inclusión en futuros estudios debe considerarse, ya que podrían identificar pacientes con diferente velocidad en la progresión de la estenosis aórtica.

- En el presente trabajo no hemos podido realizar una cuantificación objetiva de la cantidad de calcio presente en la válvula aórtica. Para realizar una comparación de este tipo habría sido necesarios los datos obtenidos mediante una estimación con TC multidetector ¹⁹³. En el momento en que se llevó a cabo la tesis no disponíamos en nuestro centro hospitalario de TC multidetector, ni contábamos con el software necesario para la cuantificación de calcio.

- Aunque nuestros hallazgos podrían sugerir una posible asociación entre estas nanopartículas y la calcificación valvular aórtica, una relación causa-efecto definitiva necesita ser establecida. Por ejemplo, sería necesario evaluar la severidad de la calcificación y la progresión de la enfermedad en la ausencia y en la presencia, y la titulación de anticuerpos de nanopartículas en humanos. En este sentido, Ertas et al ¹⁵⁸ recientemente han apoyado y consolidado esta suposición. Describieron que la media de los títulos de anticuerpos fue más elevada en los pacientes con válvula aórtica calcificada en comparación con los controles. Encontraron una correlación significativa entre los títulos de anticuerpos y el grado

de severidad de la calcificación aórtica. Además, títulos superiores de anticuerpos de las nanopartículas también se asociaron con una mayor severidad de la estenosis aórtica.

- Finalmente, en los análisis experimentales, debido a la falta de modelos de experimentación de estenosis aórtica, será complicado promover la patogenia de la calcificación en un animal sano con nanopartículas calcificadas, y la posterior identificación de las nanopartículas dentro de la calcificación valvular. No obstante, Kraemer et al ²²⁷ demostraron que las nanopartículas se pueden transmitir a animales sanos. Describieron que, en conejos adultos varones a los que se había realizado una desendotelización de una carótida, las nanopartículas calcificantes localizadas en zonas donde el endotelio de la arteria había sido dañado, provocaba una respuesta proliferativa que incluía la calcificación, en comparación con la inoculación de un lipopolisacárido de *Escherichia Coli* o con un disolvente inerte.

Capítulo 6

Conclusiones

1. Esta tesis muestra por primera vez, en una cohorte significativa de pacientes, la presencia de nanopartículas en válvulas calcificadas de pacientes con estenosis aórtica degenerativa.
2. Las nanopartículas estarían, por tanto, relacionadas con la etiopatogenia de la estenosis aórtica en los humanos, independientemente de la naturaleza de las mismas.
3. Las nanopartículas no han presentado ningún tipo de actividad metabólica, ni se ha demostrado tampoco la presencia de ácidos nucleicos; por tanto, no cumplen los criterios establecidos para ser consideradas organismos vivos.
4. El único factor predictor relacionado, en nuestra experiencia, con el crecimiento de las nanopartículas calcificantes en los medios de cultivos de las válvulas aórticas fue el sexo masculino.
5. La presencia de una mayor proporción de cultivos positivos de nanopartículas en válvulas aórticas con estenosis e insuficiencia asociadas, sugiere que el componente hemodinámico del flujo de regurgitación sometería a un mayor estrés a las células endoteliales, activándose mecanismos inflamatorios favorecedores de la calcificación por estas nanopartículas.

Apéndice I

Índice de tablas

1.	Datos ecocardiográficos de la esclerosis aórtica y la estenosis aórtica	5
2.	Prevalencia de la esclerosis aórtica en trabajos de distintos grupos.	7
3.	Prevalencia de la estenosis aórtica en diferentes grupos.	8
4.	Resumen trabajos sobre la progresión de la estenosis aórtica.	10
5.	Indicaciones de sustitución valvular aórtica en estenosis aórtica según la Sociedad Europea de Cardiología	45
6.	Indicaciones de sustitución valvular aórtica en insuficiencia aórtica según la Sociedad Europea de Cardiología	46
7.	Recomendaciones para el trasplante cardiaco	47
8.	Medidas de gravedad de la estenosis aórtica obtenidos por ecocardiografía Doppler según la American Society of Echocardiography	50
9.	Medidas de gravedad de la insuficiencia aórtica obtenidos por ecocardiografía Doppler según la American Society of Echocardiography	51
10.	Parámetros demográficos y clínicos en el conjunto de la muestra	63
11.	Datos del tratamiento de los pacientes en el momento de ingreso	64
12.	Valores analíticos en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso	65
13.	Variables ecocardiográficas y angiográficas en el conjunto de la muestra	66
14.	Resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el conjunto de la muestra	68
15.	Comparación de los parámetros demográficos y clínicos en el conjunto de la muestra	72
16.	Comparación del empleo de fármacos en el conjunto de la muestra en el momento de ingreso	73
17.	Comparación de las pruebas complementarias en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso	73

18.	Comparación del resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el conjunto de la muestra	74
19.	Comparación de los parámetros demográficos y clínicos del grupo de pacientes con valvulopatía aórtica unto de la muestra	75
20.	Comparación del empleo de fármacos en el conjunto de la muestra en el momento de ingreso	76
21.	Comparación de las pruebas complementarias en el conjunto de la muestra en el momento del ingreso	76
22.	Comparación del resultado del cultivo de las válvulas aórticas en el grupo de pacientes con valvulopatía aórtica degenerativa con el resto de los pacientes	77
23.	Variables que permanecen en el modelo de análisis multivariado en la valvulopatía aórtica degenerativa	79
24.	Comparación de los parámetros demográficos y clínicos en relación con el cultivo aórtico	80
25.	Comparación del empleo de fármacos en relación con el resultado del cultivo de la válvula aórtica en el momento de ingreso	81
26.	Comparación de las pruebas complementarias en relación con el resultado del cultivo de la válvula aórtica en el momento del ingreso	81
27.	Variables que permanecen en el modelo de análisis multivariado	82
28.	Características del grupo total y de las válvulas seleccionadas con nanopartículas calcificantes positivas	83

Apéndice II

Índice de figuras

1.	Supervivencia de pacientes con estenosis aórtica grave en función de los síntomas	15
2.	Resumen de la teoría etiopatogénica de la estenosis aórtica degenerativa	18
3.	Grupo de pacientes	62
4.	El frasco de cultivo positivo (B) muestra una película blanquecina firmemente adherida a la pared del frasco, y su ausencia en los frascos de cultivo negativo (A).	67
5.	El microscopio de barrido identificó unas partículas esferoidales calcificadas de un tamaño aproximado de 0.2 μm , rodeadas de una capsula granulosa y agrupadas entre si.	69
6.	El microscopio electrónico de transmisión muestra unas partículas pleomórficas, con un tamaño medio de 0.2-0.5 μm , y rodeadas de una capsula.	70
7.	El análisis de fluorescencia de rayos X de las nanopartículas mostró unos picos de calcio y fósforo, que son los principales componentes básicos del hidroxapatito cálcico.	71
8.	Espectros de ^1H -RMN de medios estériles envejecidos (A), medios de cultivo después de 6 semanas de crecimiento de CNP (B) y medios contaminados (C). La asignación preliminar de los picos, basada en la desviación química solamente, es la siguiente: 1, isoleucina; 2 y 3, valina; 4, ácido alfa-cetoadesámico; 5, lactato; 6, ácido dimetilmalónico; 7, alanina; 8, acetato; 9, glutamato/glutamina; 10, glutamato; 11, glucosa.	85
9.	Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales del conjunto de datos de espectros. Cada punto corresponde a un cultivo individual. Los cuadrados corresponden a medios de cultivo envejecidos; los círculos a medios procedentes de cultivos de CNP, y la estrella, a medios contaminados.	86

10. Gráficos de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real de medios de cultivo de CNP con controles positivos (flecha blanca), cultivos de CNP y controles negativos (flecha negra) y una curva estándar entre 107 y 102 copias. Todas las muestras y los controles negativos tienen valores de TC superiores a 40. 87
11. Gráfico en el que se muestra un resumen de la hipótesis de la etiopatogenia de la valvulopatía aórtica degenerativa propuesta en nuestra tesis. 100

Apéndice III

Trabajos derivados de esta Tesis

1. Artículos publicados:

- Association between self replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a posible link to valve calcification. Bratos-Pérez MA, Sánchez PL, García de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernández-Fernández JM, Di Stefano S, Orduña-Domingo A, Carrascal Y, Mota P, Martín-Luengo C, Bermejo J, San Roman JA, Rodríguez-Torres A, Fernández-Avilés F; Grupo AORTICA (Grupo de Estudio de la Estenosis Aórtica). **Eur Heart J**. 2008;29:371-6.
- Aortic Valve-derived calcifying nanoparticles: No evidence of life. Barba I, Villacorta E, Bratos-Pérez MA, Antolín M, Varela E, Sanchez PL, Tornos P, García-Dorado D. **Rev Esp Cardiol** 2012;65:813-8.

2. Abstracts a congresos:

- **SEC 2005: Congreso Anual de las Enfermedades Cardiovasculares de la Sociedad Española de Cardiología (Barcelona 26/29 Octubre 2005):**
“Implicación de las nanobacterias en la etiopatogenia de la estenosis aórtica degenerativa”. Sánchez PL, Villacorta E, García S, Di Stefano S, Carrascal Y, Mota P, Fernández-Avilés F, Bratos MA.
- **2006: World Congress of Cardiology 2006 (Barcelona 02/06 Septiembre 2006):**
“Association between nanobacteria and aortic stenosis: a possible link to valve calcification”. P.L. Sánchez Fernández. M.A. Bratos. E. Villacorta. S. Garcia. S. Distefano. Y. Carrascal. P. Mota. F. Fernández-Avilés.

3. Premios científicos obtenidos derivados del trabajo de esta Tesis

- Premio a la mejor comunicación del congreso de las enfermedades cardiovasculares 2005: “Implicación de las nanobacterias en la etiopatogenia de la estenosis aórtica degenerativa”. Otorgado por la Sociedad española de Cardiología.
- I Premio de investigación biomédica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Premio al mejor artículo publicado durante 2008 al artículo: “Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a posible link to valve calcification”.

Bibliografia

- (1) Roberts WC The senile cardiac calcification síndrome. *Am J Cardiol* 1986; 58:572-574.
- (2) O'Brien KD Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2006; 26:1721-1728.
- (3) Nightingale AK, Horowitz JD. Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk. *Heart* 2005; 91:1389-93
- (4) Carabello BA. Evaluation and management of patients with aortic stenosis. *Circulation* 2002; 105:1746-1750
- (5) Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on valvular heart disease. *Eur Heart J* 2003; 24:1231-1243.
- (6) Passik CS, Ackermann DM, Pluthh JR. Temporal changes in the causes of aortic stenosis: a surgical pathological study of 646 cases. *Mayo Clinic Proc* 1987; 62:119-123.
- (7) Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø Study. *Heart* 2013; 99:396-400.
- (8) Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener Js, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population based study. *Lancet* 2006; 368:1005-1011.
- (9) Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107:2181-2184.
- (10) Ferreira-González I, Pinar-Sopena J, Ribera A, Marsal JR, Cascant P, González-Alujas T, Evangelista A, Brotons C, Moral I, Permanyer-Miralda G, García-Dorado D, Tornos P. Prevalence of calcific aortic valve disease in the elderly and associated risk factors: a population-based study in a Mediterranean area. *Eur J Prev Cardiol* 2012; Jun 7 Epub ahead of print.

- (11) Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Phill D, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 1999;341:142-7.
- (12) Aronow WS, Ahn C, Shirani J, Kronzon I. Comparison of frequency of new coronary events in older subjects with and without valvular aortic sclerosis. *Am J Cardiol* 1999;83:599-600.
- (13) Lindroos M, Kupari M, Heikkilä J, Tilvis R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1220-1225.
- (14) Barasch E, MD, Gottdiener JS, Larsen EK, Chaves PH, Newman AB, Manolio TA. Clinical significance of calcification of the fibrous skeleton of the heart and aortoescerosis in community dwelling elderly: The cardiovascular Health study. *Am Heart J* 2006;151:39-47.
- (15) Agmon Y, Khandheria BK, Jamil Tajik A, Seward JB, Sicks JD, Fought AJ, O'Fallon WM, Smith TF, Wiebers DO, Meissner I. Inflammation, infection, and aortic valve sclerosis Insights from the Olmsted County (Minnesota) population. *Atherosclerosis* 2004;174:337-42.
- (16) Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:630-634.
- (17) Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, Applebaum RM, Kronzon I. The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening. *Arch Intern Med* 2002; 162:2345-2347.
- (18) Novaro GM, Katz R, Aviles RJ, Gottdiener JS, Cushman M, Psaty BM, Otto CM, Griffin BP. Clinical factors, but not C-Reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1992-1998.
- (19) Faggiano P, Antonini-Canterin F, Erlicher A, Romeo C, Cervesato E, Pavan D, Piazza R, Huang G, Nicolosi GL. Progression of Aortic Valve Sclerosis to Aortic Stenosis. *Am J Cardiol* 2003; 91:99-101.
- (20) Wagner S, Selzer A. Progression of aortic stenosis: a longitudinal hemodynamic study. *Circulation* 1982; 65:709-12.
- (21) Davies SW, Gershlick AH, Balcon R. Progression of valvar aortic stenosis: a long-term retrospective study. *Eur Heart J* 1991; 12:10-14.
- (22) Chietlin MD, Gertz EW, Brundage BH, Carlson CJ, Quash JA, Bode RS. Rate of progression of severity of valvular aortic stenosis in the adult. *Am Heart J* 1979; 6:689-700.
- (23) Nitta M, Nakamura T, Hultgren HN, Bilisoly J, Tovey DA. Progression of aortic stenosis in adult men: detection by noninvasive methods. *Chest* 1987; 92:40-43.
- (24) Palta S, Pai AM, Gill KS, Pai RG. New insights into the progression of aortic stenosis. *Circulation* 2000; 101:2497-2502.

- (25) Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, Kraft CD, Miyake-Hull CI, Schwaegler RG. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis: clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation* 1997; 95:2262-70.
- (26) Iivanainen AM, Lindroos M, Tilvis R, Heikkilä J, Kupari M. Calcific degeneration of the aortic valve in the old age: is the development of flow obstruction predictable? *J Intern Med* 1996; 239:269-73.
- (27) Bellamy MF, Pellikka PA, Klarich K, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1723-30.
- (28) Otto CM, Pearlman AS, Gardner CL. Hemodynamic progression of aortic stenosis in the adults assessed by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:545-550.
- (29) Bahler RC, Desser DR, Finkelhor RS, Brener SJ, Youssefi M. Factors leading to progression of valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* 1999; 84:1044-1048.
- (30) Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerdts E, Gohlke-Bärwolf C, Holme I, Kesäniemi YA, Malbecq W, Nienaber CA, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R; SEAS Investigators. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2008; 359:1343-56.
- (31) Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA; Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* 2005; 352:2389-97.
- (32) Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A and Tam J. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* 2010; 121:306-314.
- (33) Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, Sheedy PF, Turner ST, Nkomo VT, Breen JF, Maalouf J, Scott C, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Aortic valve calcification: Determinants and Progression in the population. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2007; 27:642-648.
- (34) Nassimiha D, Aronow WS, Ahn C, Goldman ME. Association of coronary risk factors with progression of valvular aortic stenosis in older persons. *Am J Cardiol* 2001; 87:1313-14.
- (35) Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of valvular aortic stenosis in older persons. *Am J Cardiol* 2001; 88:693-95.
- (36) Sanchez PL, Santos JL, Kaski JC, Cruz I, Arribas A, Villacorta E, Cascon M, Palacios IF, Martin-Luengo C Grupo AORTICA (Grupo de estudio de la Estenosis Aórtica). Relation of circulating C-reactive protein to progression of aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* 2006; 97:90-93.

- (37) Gómez M, Cladellas M, Molina L, Fitó M, Covas MI, Vila K, Roqueta C, Bruguera J. Marcadores séricos de progresión hemodinámica en la estenosis aórtica degenerativa. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61(Sup 3):89.
- (38) Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2001; 104:2205-9.
- (39) Ross J Jr, Braunwald E. Aortic stenosis. *Circulation* 1968; 38 (1 Suppl):61-7.
- (40) Olsen MH, Wachtell K, Bella JN, Gerdtts E, Palmieri V, Nieminen MS, Smith G, Ibsen H, Devereux RB. Aortic valve sclerosis relates to cardiovascular events in patients with hypertension (a LIFE Substudy). *Am J Cardiol* 2005; 95:132-136.
- (41) Kelly TA, Rothbart RM, Cooper CM, et al. Comparison of outcome of asymptomatic to symptomatic patients older than 20 years of age with valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* 1988; 61:123-130.
- (42) Pellikka PA, Nishimura RA, Baikely KR, et al. The natural history of adults with asymptomatic, hemodinamically significant aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:1012-1017.
- (43) Amato MC, Moffa PJ, Werner KE, ramires JA. Treatment decision in asymptomatic aortic valve stenosis:role of exercise testing. *Heart* 2001; 86:381-6.
- (44) Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Iung B, Kasprzak, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A. Guidelines on the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 2007 28:230-268.
- (45) Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005; 111:3316-3326.
- (46) Mönckerberg JG. Der normale histolog ische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *Virchows Arch Pathol Physiol* 1904; 472-514.
- (47) Sell S, Scully RE. Aging changes in the aortic and mitral valves: histologic and histochemical studies, with observations on the pathogenesis of calcific aortic stenosis and calcification of the mitral annulus. *Am J Pathol* 1965; 46:345-365.
- (48) Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM. Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 2003; 91:97-99.
- (49) Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gow AM, O´Brien KD. Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994 90:844-853.

- (50) Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart* 2001; 85:635– 638.
- (51) Nordström P, Glader CA, Dahlen G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenstrom A, Lorentzon M. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *J Intern Med* 2003; 254:140 –146.
- (52) Ortlepp JR, Schmitz F, Mevissen V, Weiss S, Huster J, Dronskowski R, Langebartels G, Autschbach R, Zerres K, Weber C, Hanrath P, Hoffmann R. The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J* 2004;25:514-522.
- (53) Caverzasio J Wnt/LRP5, a new regulation osteoblastic pathway involved in reaching peak bone masses. *Rev Med Suisse Romande* 2004; 124:81-2.
- (54) Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and-independent manner. *J Biol Chem* 2002; 280:2388-94.
- (55) Wang HY, Malbon CC. Wnt Signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* 2003; 300:1529-30.
- (56) Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH 1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005; 437:270-274.
- (57) Wang N, Miao H, Li YS, Zhang P, Haga JH, Hu Y, Young A, Yuan S, Nguyen P, Wu CC, Chien S. Shear stress regulation of Krüppel-like factor 2 expression is flow pattern-specific. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:1244-1251.
- (58) Matsumoto Y, Adams V, Walther C, Kleinecke C, Brugger P, Linke A, Walther T, Mohr FW, Schuler G. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J* 2009; 30:346-355.
- (59) Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120:513–22.
- (60) Kurz DJ, Kloeckener-Gruissem B, Akhmedov A, Eberli FR, Bühler I, Berger W, Bertel O, Lüscher TF. Degenerative aortic valve stenosis, but not coronary disease, is associated with shorter telomere length in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:e114 –7.
- (61) Verrier ED, Boyle Jr EM. Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:915-922.
- (62) Ghaisas NK, Foley JB, O’ Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels, and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:2257-2262.

- (63) Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Rosenqvist M, Ryden L, Nilsson J. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1162–1170.
- (64) Simmons CA. Aortic Valve Mechanics. An emerging role for the endothelium. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1456-1458.
- (65) El-Hamamsy I, Balachandran K, Yacoub MH, Stevens LM, Sarathchandra P, Taylor PM, Yoganathan AP, Chester AH. Endothelium-Dependent Regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1448-1455.
- (66) Atkins GB, Jain MK. Role of Krüppel Like Transcription Factors in Endothelial Biology. *Circ Res* 2007;100:1686-1695.
- (67) Olsson M, Rosenqvist M, Nilsson J. Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1664 –1671.
- (68) Jian B, Narula N, Li QY, Mohler III ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:457-465.
- (69) Mohler ER, III, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane Mg, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001; 103:1522-1528.
- (70) Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mayranpaa M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valve. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1859 –1866.
- (71) Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, Sarikoc A, Pinol R, Hagl S, Brueckmann M, Borggrefe M. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14:80-87.
- (72) Meng X, Ao L, Song Y, Babu A, Yang X, Wang M, Weyant MJ, Dinarello CA, Cleveland JC Jr, Fullerton DA. Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:29-35.
- (73) Gerber Y, Goldbourt U, Feinberg MS, Segev S, Harats D. Are triglyceride-rich lipoproteins associated with aortic valve sclerosis? A preliminary report. *Atherosclerosis* 2003; 170:301-305.
- (74) Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 1999; 19:1218-1222.
- (75) Cohen DJ, Malave D, Ghidoni JJ, Iakovidis P, Everett MM, You S, Liu Y, Boyan BD. Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis: an animal model. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:537-543.

- (76) O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL. Association of Angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* 2002; 106:2224 –2230.
- (77) Helske S, Syvaranta S, Kupari m, LappalainenJ, Laine M, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *Eur Heart J* 2006; 27:1495-1504.
- (78) Tiede K, Stoter K, Petrik C, Chen WB, Ungefroren H, Kruse ML, Stoll M, Unger T, Fischer JW. Angiotensin II AT(1)-receptor induces biglycan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGF in vitro. *Cardiovasc Res* 2003; 60:538 –546.
- (79) Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Andersen GG, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H. Induction of myocardial biglycan in heart failure in rats—an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism. *Cardiovasc Res* 2003; 60:557–568.
- (80) Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:57–66.
- (81) O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92:2163–2168.
- (82) Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, Gannon FH. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 1999; 8:254–260.
- (83) Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, Temoli E, Alamanni F. Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention *Eur J Cardiothorac Surg* 2009; 35:493-504.
- (84) Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Fukuda K. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med* 2009; 87:17-24.
- (85) Satta J, Melkko J, Pollanen R, Tuukkanen J, Paakko P, Ohtonen P, Mennander A, Soini Y. Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:96-101.
- (86) Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol.* 2001; 159:321-327.
- (87) Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005; 115:1210 –1220.
- (88) Arishiro K, Hoshiga M, Negoro N, Okabe T, Ishihara T, Hanafusa T. Angiotensin Receptor 1 Blocker Reduces Atherosclerotic Changes of Aortic

- Valve in Hypercholesterolemic Rabbit Model. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:284A–285A.
- (89) Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T, Broqvist M. Lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart* 2002; 88:348–351.
- (90) Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, McConnell JP, Singh RJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart* 2005; 91:806 – 810.
- (91) Rajamannan NM, Nealis TB, Subramaniam M, Pandya S, Stock SR, Ignatiev CI, Sebo TJ, Rosengart TK, Edwards WD, McCarthy PM, Bonow RO, Spelsberg TC. Calcified rheumatic valve neoangiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation. *Circulation* 2005; 111:3296 –3301.
- (92) Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, Bamgartner H. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation* 2004; 110:1291-1295.
- (93) Skowasch D, Schrempf S, Wernet N, Steinmetz M, Jabs A, Tuleta I, Welsch U, Preusse CJ, Likungu JA, Welz A, Lüderitz B, Bauriedel G. Cells of primarily extravascular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses. *Eur Heart J*. 2005; 26:2576-2580.
- (94) Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:850–855.
- (95) Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, Achenbach S. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* 2001; 104:1927–1932.
- (96) Chan KL. Is aortic stenosis a preventable disease? *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:593-599.
- (97) Goldberg SH, Elamariah S, Miller MA, Fuster V. Insights Into Degenerative aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 13:1205-1213.
- (98) Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:937–54.
- (99) Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrixdegrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:402– 406.
- (100) Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92:1393–1398.

- (101) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94:2493–2503.
- (102) Gelosa P, Cimino M, Pignieri A, Tremoli E, Guerrini U, Sironi L. The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3:567-577.
- (103) Werba JP, Tremoli E, Massironi P, Camera M, Cannata A, Alamanni F, Biglioli P, Parolari A. Statins in coronary bypass surgery: rationale and clinical use. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:2132-2140.
- (104) Lieve V, Brueckmann M, Borggrefe M, Kaden JJ. Statin therapy of calcific aortic stenosis: hype or hope? *Eur Heart J* 2006; 27:773-778.
- (105) Moura LM, Maganti K, Puthumana JJ, Rocha-Goncalves F, Rajamannan NM. New understanding about calcific aortic stenosis and opportunities for pharmacological intervention. *Curr Opin Cardiol* 2007; 22:572-577.
- (106) Rashidi A, Adler DS, Casscells W, Madjid M. Is it time to prescribe statins to patients with calcified aortic stenosis? *Am Heart J* 2005; 150:41-45.
- (107) Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Cihan G, Caldir V, Cay S, Kisacik HL, Korkmaz S. Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression. *Am Heart J* 2004; 147:915-918.
- (108) Farmer JA. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2:208–217.
- (109) Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Gonçalves F, Rajamannan. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:554–461.
- (110) Antonini-Canterin F, Hirsu M, Popescu BA, Leiballi E, Piazza R, Pavan D, Ginhina C, Nicolosi GL. Stage-related effect of statin treatment on the progression of aortic valve sclerosis and stenosis. *Am J Cardiol* 2008; 102:738-742.
- (111) O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a) and E accumulate in the morphologically early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:523–532.
- (112) Ngo DT, Stafford I, Sverdlov AL, Qi W, Wuttke RD, Zhang Y, Kelly DJ, Weedon H, Smith MD, Kennedy JA, Horowitz JD. Ramipril retards development of aortic valve stenosis in a rabbit model: mechanistic considerations. *Br J Pharmacol* 2011; 162:722-732.
- (113) O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT, Nasir K, Takasu J, Shavelle DM, Wu AH, Zhao XQ, Budoff MJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium. *Arch Intern Med* 2005; 165:858-862.
- (114) Wakabayashi K, Tsujino T, Naito Y, Ezumi A, Lee-Kawabata M, Nakao S, Goda A, Sakata Y, Yamamoto K, Daimon T, Masuyama T. Administration of angiotensin-converting enzyme inhibitors is associated with slow

- progression of mild aortic stenosis in Japanese patients. *Heart Vessels* 2011; 26:252-7.
- (115) Gkizas S, Koumoundouro D, Sirinian X, Rokidi S, Mavrilas D, Koutsoukos P, Papalois A, Apostokalis E, Alexopoulos D, Papadaki H. Aldosterone receptor blockade inhibits degenerative processes in the early stage of calcific aortic stenosis. *Eur J Pharmacol* 2010; 642:107-112.
 - (116) Stewart RA, Kerr AJ, Cowan BR, Young AA, Occleshaw C, Richards AM, Edwards C, Whaley GA, Freidlander D, Williams M, Doughty RN, Zeng I, White HD, ZEST Study Investigators. A randomized trial of the aldosterone-receptor antagonist eplerone in asymptomatic moderate-severe aortic stenosis. *Am Heart J* 2008; 156:348-355.
 - (117) Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:817-24.
 - (118) Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 2005; 280:7317-7325.
 - (119) Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4:711-9.
 - (120) Skolnick AH, Osranek M, Formica P, Kronzon I. Osteoporosis treatment and progression of aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* 2009; 104:122-124.
 - (121) Innasimuthu AL, Katz WE. Effect of bisphosphonates on the progression of degenerative aortic stenosis. *Echocardiography* 2011; 28:1-7.
 - (122) Aksoy O, Cam A, Goel SS, Houghtaling PL, Williams S, Ruiz-Rodriguez E, Menon V, Kapadia SR, Tuzcu EM, Blackstone EH, Griffin BP. Do Biphosphonates slow the progression of aortic stenosis? *J Am Coll Cardiol* 2012; 59:1452-9.
 - (123) Lindblom D, Lindblom U, Qvist J, Lundstrom H. Long-term relative survival rates after heart valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:566-573.
 - (124) Igual A. Registro español de actividad de cirugía cardiovascular 2007. 2008
 - (125) Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG et al; PARTNER Trial Investigators. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med* 2010; 363:1597-607.
 - (126) Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG et al; PARTNER Trial Investigators. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med* 2011; 364:2187-98.
 - (127) Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB. Percutaneous transcatheter

- implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation* 2002 ; 106:3006-3008.
- (128) Webb JG, Pasupati S, Humphries K, Thompson C, Altwegg L, Moss R, Sinhal A, Carere RG, Munt B, Ricci D, Ye R, Cheung A, Lichtenstein SV. Percutaneous transarterial aortic valve replacement in selected high-risk patients with aortic stenosis. *Circulation* 2007; 116:755-763.
 - (129) García E, Pinto AG, Cebada FS, Pello AM, Paz M, García-Fernández MA, Ortal J. Implantación percutánea de prótesis valvular aórtica: experiencia inicial en España. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61:1210-1214.
 - (130) Zajarias A, Cribier A. Outcomes and safety of percutaneous aortic valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1829-1836.
 - (131) Vaturi MV, Perl L, Leshem-Lev D, Dadush O, Bental T, Sahpira Y, Yedidya I, Greeberg G, Kornowski R, Sagie A, Battler A, Lev EI. Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Dysfunctional Versus Normally Functioning Congenitally Bicuspid Aortic Valves. *Am J Cardiol* 2011; 108:272-6.
 - (132) Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8274-8279.
 - (133) Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swain W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11511-11515.
 - (134) Folk, R. L. J. Sediment. *Petrol* 1993; 63:990-999.
 - (135) Ciftcioglu N, Pelttari A, Kajander EO. Extraordinary growth phases of nanobacteria isolated from mammalian blood. *Proc SPIE* 1997; 3111:429-435.
 - (136) Hu YR, Zhao Y, Sun YW, Lü WD, Liu ZL, Li JM, Wu ZS, Tang H, Gao F, Zhou XM. Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol* 2010; 31:2934-43.
 - (137) Raoult D, Drancourt M, Azza S, Nappiez C, Guieu R, Rolain JM, fourquet P, Campagna B, La Scola B, Mege JL, Manseulle P, Lechevalier E, Berland Y, Gorvel JP, Renesto P. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. *PLoS Pathog* 2008; 4:e41.
 - (138) Urbano P, Urbano F. Nanobacteria: Facts or Fancies? *PLoS Pathog* 2007; 3:e55.
 - (139) Tanner, M. A., Goebel, B. M., Dojka, M. A., Pace, N. R. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants *Appl. Environ. Microbiol* 1998; 64:3110-3113.
 - (140) Bjorklund M, Ciftcioglu N, Kajander EO. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. *Proc SPIE* 1997; 3111:123-129.
 - (141) Kajander, E. O., Tahvanainen, E., Kuronen, I, Ciftcioglu, N. *Zentralbl Bakteriolog Suppl* 1994; 26:147-149.

- (142) Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjelle JT, Kajander EO. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2077-2086.
- (143) Ciftcioglu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology* 1998; 4:259-270.
- (144) Ciftcioglu N, Aho KM, Mc Kay DS, Kajander EO. Are apatite nanoparticles safe? *Lancet* 2007; 369:2078.
- (145) Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, Coulange C, Ragni E, Alasia C, Dussol B, Berland Y, Raoult D. Attempted isolation of *Nanobacterium* sp. Microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003; 41:368-372.
- (146) Benzerara K, Miller VM, Barell G, Kumar V, Miot J, Brown GE Jr, Lieske JC. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft x-ray spectromicroscopy. *J Invest Med* 2006; 54:367-379.
- (147) Maniloff J, Nealson KH, Psenner R, Loferer M, Folk RL. Nanobacteria: size limits and evidence. *Science* 1997; 276:1773-1776.
- (148) Glas JJ, Assad-garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:425-430.
- (149) Martel J, Young JD. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5549-5554.
- (150) Young JD, Martel J, Young D, Young A, Hung CC, Young L, Chao YJ, Young J, Wu CY. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineral-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS ONE* 2009; 4:e5421.
- (151) Kajander EO, Kuronen I, Aberman K, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on earth. *Proc SPIE* 1997 3111:420-428.
- (152) Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR III, Folk RL, Rzewuska-Lech E, Kumar V, Farrell-Baril G, Lieske JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H1115-H1124.
- (153) Mathew G, McKay DS, Ciftcioglu N. Do blood-borne calcifying nanoparticles self-propagate? *Int J Nanomedicine* 2008; 3:265-275.
- (154) Puskas LG, Tiszlavicz L, Razga Z, Torday LL, Krenacs T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques *Acta Biol Hung* 2005; 56:233-245.
- (155) Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy *Pathophysiology* 2004; 11:95-101.

- (156) Zhu J, Kajander EO, Katz RJ, Ciftcioglu N, Canos DA, Pinnow EE, Famogun Y, Pichard A. Increased serum levels of nanobacteria antibodies are associated with high coronary calcification score. *Circ Suppl* 2004; 110:627.
- (157) Jelic TM, Chang HH, Roque R, Malas AM, Warren SG, Sommer AP. Nanobacteria-associated calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 2007; 16:101-105.
- (158) Ertas FS, Hasan C, Ozdol O, Akan C, Tulunay T, Kocum S, Uysal I, Dincer M, Sahin Y, Atmaca N, Ciftcioglu N, Kajander EO, Erol C. Association between nanobacteria and aortic valve calcification. *Eur Heart J* 2006; 27:745.
- (159) Jelic TM, Malas AM, Groves SS, Jin B, Mellen PF, Osborne G, Roque R, Rosencrance JG, Chang HH. Nanobacteria-caused mitral valve calciphylaxis in a man with diabetic renal failure. *South Med J* 2004; 97:194-198.
- (160) Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuoikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999 56:1893-1898.
- (161) Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, Miao XY, Wang QW, Hang SF, Yang J, Kajander EO, Ciftcioglu N. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118:421-424.
- (162) Hudelist G, Singer CF, Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, Czewenka K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology* 2004; 45:633-637.
- (163) Sevidy R, Battistutti WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS* 2003; 111:951-954.
- (164) Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, Caughey RC, Brown R, Millikin PD, Darras FS. Endotoxin and nanobacteria in polycystic Kidney disease. *Kidney Int* 2000; 57:2360-2374.
- (165) Shoskes DA, Thomas KD, Gomez E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience. *J Urol* 2005; 173:474-477.
- (166) Shiekh FA, Khullar M, Singh SK. Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. *Urol Res* 2006; 46:2077-2086.
- (167) Cuerpo GE, Kajander EO, Ciftcioglu N, Castellano LF, Correa C, Gonzalez J, Mampaso F, Liano F. Nanobacteria. Un modelo de neo-litogenesis experimental. *Arch Esp Urol* 2000; 53:291-303.
- (168) Wang L, Shen W, Wen J, An X, Cao L, Wang B. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1126-1132.
- (169) Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. ESC Guidelines

- for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur J Heart Failure* 2008; 933-989.
- (170) Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton, Stewart W. Recommendations for chamber Quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the chamber quantification writing group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Eur J Echocardiogr* 2006; 7:79-108.
 - (171) Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka PA, Quiñones M. Echocardiographic Assessment of Valve Stenosis: EAE/ASE Recommendations for Clinical Practice. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22:1-23.
 - (172) Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn A, Kraft CD, Levine RA, Nihoyannopoulos P, Otto CM, Quinones MA, Rakowski H, Stewart WJ, Waggoner A, Weissman NJ. American Society of Echocardiography: recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography: A report from the American Society of Echocardiography's Nomenclature and Standards Committee and The Task Force on Valvular Regurgitation, developed in conjunction with the American College of Cardiology Echocardiography Committee, The Cardiac Imaging Committee, Council on Clinical Cardiology, The American Heart Association, and the European Society of Cardiology Working Group on Echocardiography 2003; 4:237-261.
 - (173) Barba I, De León G, Martín E, Cuevas A, Aguade S, Candell-Riera J. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischaemia in patients with suspected coronary artery disease. *Magn Reson Med* 2008; 60:27-32.
 - (174) Manichanh C, Reeder J, Gibert P, Varela E, Llopis M, Antolin M, et al. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res* 2010; 20:1411-9.
 - (175) Bratos-Pérez MA, Sánchez PL, García de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernández-Fernández JM, Di Stefano S, Orduña-Domingo A, Carrascal Y, Mota P, Martín-Luengo C, Bermejo J, San Román JA, Rodríguez-Torres A, Fernández-Avilés F. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J* 2008; 29:371-376.
 - (176) Lehninger A. Principles of biochemistry. 2^a ed. Worth Publishers 1993
 - (177) Barba I, Villacorta E, Bratos-Pérez MA, Antolín M, Varela E, Sánchez PL, Tornos P, García-Dorado D. Nanopartículas derivadas de válvula aórtica: sin evidencias de vida. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65:813-818.
 - (178) Ouyang P, Vaidya D, Dobs A, Golden SH, Szklo M, Heckbert SR, Kopp P, Gapstur SM. Sex hormone levels and subclinical atherosclerosis in postmenopausal women: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 204:255-261.

- (179) McCrohon JA, Death AK, Nakla S, et al. Androgen receptor expression is greater in macrophages from male than from female donors. A sex difference with implications for atherogenesis. *Circulation* 2000; 101:224-6.
- (180) McCrohon JA, Jessup W, Handelsman DJ, Celermajer DS. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 1999; 99:2317-22.
- (181) Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:549-53.
- (182) Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, et al. Differential expression of bone regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1998-2003.
- (183) Gannage-Yared MH, Fares F, Semaan M, et al. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin Endocrinol* 2006; 64:652-8.
- (184) Khosla S, Arrighi HM, Melton III LJ, et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002; 13:394-9.
- (185) Choi BG, Vilahur G, Cardoso L, et al. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur J Clin Invest* 2008; 38:211-7.
- (186) Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM et al. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:546-54.
- (187) Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, Meghani M, Akhtar M, Constantino T. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013; 11:55-9.
- (188) Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H, Nerem RM. Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: Influence of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:69-77.
- (189) Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1985; 5:293-302.
- (190) Kleinstreuer C, Hyun S, Buchanan JR Jr, Longest PW, Archie JP Jr, Truskey GA. Hemodynamic parameters and early intimal thickening in branching blood vessels. *Crit rev Biomed Eng* 2001; 29:1-64.
- (191) Himburg HA, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack JA, Li XM, Friedman MH. Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H1916-H1922.

- (192) Koos R, Brandenburg V, Mahnken AH, Mühlenbruch WJ, Kelm M, Kühl HP. Association of fetuin-A levels with the progression of aortic valve calcification in non-dialyzed patients. *Eur Heart J* 2009; 30:2054-2061.
- (193) Morgan-Hughes GJ, Roobottom CA, Marshall AJ. Aortic valve imaging with computed tomography: a review. *J Heart Valve Dis* 2002; 11:604-11.
- (194) Miller VM, Lieske JC, Salhudeen AK. Introduction to pathological calcification: cristallization, infection, or cellular transdifferentiation *J Investig Med* 2006; 54:365-366.
- (195) Ciftcioglu N, McKay DS, Mathew G, Kajander EO. Nanobacteria: fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Investig Med* 2006; 54:385-394.
- (196) Pereto J. Controversies on the origin of life. *Int Microbiol* 2005; 8:23-31.
- (197) Pennisi E. DNA study forces rethink of what it means to be a gene. *Science* 2007; 316:1556-1557.
- (198) Shapiro R. Small molecule interactions were central to the origin of life. *Q Rev Biol* 2006; 81:105-125.
- (199) Kumar V, Farrell G, Harrington S, Fitzpatrick L, Rzewuska E, Miller VM, Lieske JC. Cell biology of pathological renal calcification: contribution of crystal transcytosis, cell-mediated calcification, and nanoparticles. *J Investig Med* 2006; 54:412-424.
- (200) Martínez-Pérez I, Moreno A, Alonso J, Aguas J, Conesa G, Capdevila A et al. Diagnosis of brain abscess by magnetic resonance spectroscopy. Report of two cases. *J Neurosurg* 1997; 86:708-13.
- (201) Kim TH, Kim HR, Myung SC. Detection of nanobacteria in patients with chronic prostatitis and vaginitis by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Korean J Urol* 2010; 52:194-9.
- (202) Young JD, Martel J, Young L, Wu CY, Young A, Young D. Putative Nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis. *PLoS ONE*. 2009; 4:e4417.
- (203) García-Ruiz JM, Melero-García E, Hyde ST. Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. *Science* 2009; 323:362-5.
- (204) Ketteler M, Wnnaer C, Metzger T, et al. Deficiencies of calcium- regulatory proteins in dialysis patients: a novel concept of cardio-vascular calcification in uremia. *Kidney Int Suppl* 2003; S84-S87.
- (205) Schafer C, Heiss A, Schwarz A, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003; 112:357-366.
- (206) Heiss A, DuChesne A, Denecke B, et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 2003; 278:13333-13341.

- (207) Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* 2002; 277:3926-3934.
- (208) Binkert C, Demetriou M, Sukhu B, Szweras M, Tenebaum HC, Dennis JW. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J Biol Chem* 1999; 274:28514-28520.
- (209) Gómez-Doblas JJ. Valvulopatías en la mujer: diferencias de sexo en España. *Rev Esp Cardiol* 2008; 8:42D-48D.
- (210) Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; 102:2636-2642.
- (211) Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, et al. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 67:2295-2304.
- (212) Szweras M, Liu D, Partidge EA et al. Alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodelling. *J Biol Chem* 2002; 277:19991-19997.
- (213) Jersmann HP, Dransfield I, Hart SP. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci* 2003; 105:273-278.
- (214) Reynolds JL, Skepper JN, McNair R et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2920-2930.
- (215) Hart SP, Jackson C, Kremmel LM et al. Specific binding of an antigen-antibody complex to apoptotic human neutrophils. *Am J Pathol* 2003; 162:1011-1018.
- (216) Lewis JG, Andre CM. Enhancement of human monocyte phagocytic function by alpha 2HS glycoprotein. *Immunology* 1981; 42:481-487.
- (217) Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; 87:1055-1062.
- (218) Floegen J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:V59-V66.
- (219) Kaden JJ, Reinöhl JO, Blesch B, Brueckmann M, Haghi D, Borggrefe M, Schmitz F, Klomfass S, Pillich M, Ortlepp JR. Systemic and local levels of fetuin-A in calcific aortic valve stenosis. *Int J Mol Med* 2007; 20:193-197.
- (220) Ferrari G, Sainger R, Beckmann E, Keller G, Yu PJ, Monti MC, Galloway AC, Weiss RL, Vernick W, Grau JB. Validation of plasma biomarkers in degenerative calcific aortic stenosis; *J Surg Res* 2010; 163:12-17.

- (221) Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, Brandenbrug VM, Ketteler M, Whooley MA. Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease. Data from Heart and Soul study. *Circulation* 2007; 115:2533-2539.
- (222) Kazama JJ, Gejyo F, Ei I. The immunohistochemical localization of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A (AHSG). *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:851-852.
- (223) Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richter W, van Dorp W, et al. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem* 2008; 283:14815-14825.
- (224) Triffitt JT, Gebauer U, Ashton BA, Owen ME, Reynolds JJ. Origin of plasma α_2 HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* 1976; 262:226-227.
- (225) Kim BH, Park HS, Kim HJ, Kim GT, Chang IS, Lee J, Phung NT. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl Microbial Biotechnol* 2004; 63:672-681.
- (226) Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodovar LF, Juárez-Tosina R, De la Cuesta F, Álvarez-Llamas G et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63:46-53.
- (227) Kraemer MA, Farrell-Baril G, Lieske JC, Miller VM. Biological nanoparticles